

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON (I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 · N° 634

**ETUDE DES DIFFERENTES FORMES D'EXCRETION
URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE
CHEZ DES SUJETS NORMAUX ET PARAPLEGIQUES**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Section de Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

Le 16 Juin 1977

par

Madame Christiane FINCK

née le 24 Avril 1947

à LYON 4^e

Travail du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Henry Gabrielle
(SAINT-GENIS-LAVAL)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON (I)

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 634

**ETUDE DES DIFFERENTES FORMES D'EXCRETION
URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE
CHEZ DES SUJETS NORMAUX ET PARAPLEGIQUES**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Section de Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

Le 16 Juin 1977

par

Madame Christiane FINCK

née le 24 Avril 1947

à LYON 4^e

Travail du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Henry Gabrielle
(SAINT-GENIS-LAVAL)

Année 1977 - N° 634

ETUDE DES DIFFÉRENTES FORMES D'EXCRETION
URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE
CHEZ DES SUJETS NORMAUX ET PARAPLÉGIQUES

THÈSE



POUR LE DOCTEUR EN PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Section de Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

Le 16 Juin 1977

par

Madame Christiane PINK

née le 24 Avril 1947

à LYON 4^e

Travail du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Henry Gabrielle
(SAINT-GENIS-LAVAL)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

MEDECINE GRANGE-BLANCHE

Monsieur Bernard SALLE, Maître de Conférences Agrégé

MEDECINE ALEXIS-CARREL

Monsieur le Professeur René MORNEIX

MEDECINE LYON-NORD

Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, Maître de Conférences Agrégé

MEDECINE SUD-OUEST

Monsieur le Professeur Jean NORMAND

SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Monsieur le Professeur Charles-Albert BIZOLLON

TECHNIQUES DE READAPTATION

Monsieur Alain MORGON, Maître de Conférences Agrégé

BIOLOGIE HUMAINE

Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, Maître de Conférences Agrégé

INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE

Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Monsieur le Docteur Roger VINCENT

MATHEMATIQUES

Monsieur le Professeur Edmond COMBET

PHYSIQUE

Monsieur le Professeur Jean DELMAU

CHIMIE-BIOCHIMIE

Monsieur le Professeur Jean HUET

SCIENCES DE LA NATURE

Monsieur le Professeur René GINET

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES

Mademoiselle le Professeur Jeanne-Françoise WORBE

PHYSIQUE-NUCLEAIRE

Monsieur le Professeur Mark GUSAKOW

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 1

Monsieur le Professeur Bernard POUYET

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 2

Monsieur Jean GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON

Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

MECANIQUE

Mademoiselle le Professeur Geneviève COMTE-BELLOT

A ma grand-mère

A mes parents

A ma fille

A notre Maître et Président de Thèse
Monsieur le Professeur A. REVOL

Il nous a guidée durant notre travail de ses conseils
bienveillants et éclairés.

Son dynamisme, l'étendue de ses connaissances et sa
grande compréhension ont toujours fait notre admiration.

Nous le remercions du fond du coeur de la confiance qu'il
nous a accordée et des heures précieuses qu'il nous a
consacrées.

Monsieur le Professeur J. DORCHE

C'est comme Externe dans son Service, en 1968, et durant deux semestres, qu'il a su nous faire apprécier et aimer le travail de Laboratoire. Nous avons toujours été très sensible à sa bienveillante simplicité.

Nous sommes fière d'être son élève.

Sa présence dans ce jury est un grand honneur pour nous.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre profonde reconnaissance et toute notre gratitude.

Monsieur le Professeur J. BOURRET

Nous avons été conquise par sa gentillesse et sa disponibilité pour nous aider à résoudre et aplanir les petits problèmes internes aux Services.

C'est un grand honneur pour nous qu'il ait accepté de siéger dans notre jury. Nous lui exprimons tout notre attachement et nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur J.J. VALLON

Nous admirons sa haute compétence scientifique, son esprit critique et son intégrité.

Nous sommes fière qu'il ait bien voulu s'intéresser à notre thèse et la juger.

Nous lui exprimons notre amicale reconnaissance.

A Monsieur le Docteur P. MINAIRE

En remerciement de notre amicale collaboration
tout au long de cette étude.

A Monsieur Ph. MESSY

Service du Professeur SITE

Laboratoire d'Informatique Médicale Hôtel-Dieu

qui a réalisé tous les calculs statistiques et dont nous
avons apprécié la compétence et le dévouement.

Nous le remercions de sa participation à notre thèse et du
vif intérêt qu'il a montré pour cette étude.

Aux malades

A tout le personnel de l'Hôpital Henry Gabrielle

Aux membres du Laboratoire de Biochimie

sans qui ce travail n'aurait pu être effectué.

Nous les remercions de leur amicale et aimable collaboration.

P L A N



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1 . <u>INTRODUCTION</u> .	7
2 . <u>PROBLEME MEDICAL : les conséquences d'une immobilisation prolongée</u> .	8
2 . 1 . L'ostéoporose aiguë d'immobilisation	8
2 . 2 . Les para-ostéo-arthropathies neurogènes	9
3 . <u>GENERALITES SUR L'HYDROXYPROLINE</u> .	11
3 . 1 . Répartition de l'hydroxyproline dans l'alimentation	12
3 . 2 . Répartition de l'hydroxyproline dans les tissus	13
3 . 3 . Métabolisme de l'hydroxyproline	13
3 . 3 . 1 .. Structure du collagène	14
3 . 3 . 2 . Biosynthèse du collagène	14
3 . 3 . 3 . Catabolisme de l'hydroxyproline et forme d'excrétion	16
4 . <u>ORIGINE ET NATURE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE LIBRE ET TOTALE</u> .	19
4 . 1 . Nature de l'hydroxyproline urinaire	19
4 . 2 . Origine et signification physiologique	20
4 . 3 . Variations physiopathologiques de l'hydroxyproline urinaire totale	21
5 . <u>ORIGINE ET ISOLEMENT DES PEPTIDES URINAIRES A HYDROXYPROLINE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE NON DIALYSABLES</u> .	21
5 . 1 . Travaux antérieurs	21
5 . 2 . But de notre recherche	23
6 . <u>DONNEES ANALYTIQUES</u> .	24
6 . 1 . Isolation et séparation de l'hydroxyproline par chromatographie de partage ou électrophorèse	24
6 . 2 . Dosage de l'hydroxyproline urinaire	25
6 . 2 . 1 . Dosage colorimétrique manuel	25
6 . 2 . 1 . 1 . Hydrolyse	25

6 . 2 . 1 . 2 . Purification	27
6 . 2 . 1 . 3 . Neutralisation	28
6 . 2 . 1 . 4 . Oxydation	28
6 . 2 . 1 . 5 . Extraction des dérivés d'oxydation	28
6 . 2 . 1 . 6 . Réaction colorée au para-diméthyl-amino-benzaldehyde	30
6 . 2 . 2 . Dosage automatique sur auto-analyseur	30
6 . 2 . 3 . Chromatographie en phase gazeuse	30
6 . 3 . Dosage de l'hydroxyproline plasmatique	31
6 . 4 . Etude in vivo à l'aide de radio-traceurs	32

PARTIE EXPERIMENTALE 33

MATÉRIEL ET MÉTHODES 34

1 . MATERIEL HUMAIN . 35

1 . 1 . Choix des témoins (sujets normaux) 35

1 . 2 . Choix des malades 35

2 . NATURE DU REGIME ALIMENTAIRE . 36

2 . 1 . Témoins 37

2 . 2 . Les sujets malades 38

3 . PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES URINES . 38

4 . METHODE DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE UTILISEE . 39

4 . 1 . Matériel et méthode 41

4 . 1 . 1 . Matériel 41

4 . 1 . 2 . Réactifs 41

4 . 1 . 3 . Méthode 42

4 . 1 . 3 . 1 . Hydrolyse 42

4 . 1 . 3 . 2 . Neutralisation et élution 43

4 . 1 . 3 . 3 . Oxydation 44

4 . 1 . 3 . 4 . Réaction colorée 44

4 . 2 . Intérêt de la méthode employée 47

5 .	<u>METHODE DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE LIBRE .</u>	47
5 . 1 .	Description de la méthode	47
5 . 2 .	Calculs des résultats	49
6 .	<u>ISOLEMENT ET DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE .</u>	49
6 . 1 .	Technique de dialyse	49
6 . 2 .	Matériel	49
6 . 2 . 1 .	Méthode	50
6 . 2 . 2 .	Calcul des résultats	51
	RÉSULTATS	53
1 .	<u>ASPECTS ANALYTIQUES CONCERNANT LA METHODE UTILISEE .</u>	54
1 . 1 .	Etude de l'influence de la conservation des échantillons sur le taux d'hydroxyproline totale	54
1 . 1 . 1 .	Résultats	54
1 . 1 . 2 .	Conclusions	54
1 . 2 .	Etude de la répétabilité de la méthode de dosage de l'hydroxypro- line libre	56
1 . 2 . 1 .	Résultats	56
1 . 2 . 2 .	Conclusions	56
2 .	<u>VALEURS DE REFERENCE DES DIFFERENTES FORMES D'EXCRETION URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ LES SUJETS AMBULATOIRES TEMOINS EN FONCTION DU REGIME ALIMENTAIRE .</u>	57
2 . 1 .	Régime sans collagène : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai	59
2 . 2 .	Alimentation normale : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai	60
2 . 3 .	Régime chargé en collagène : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai	61
2 . 4 .	Détermination des moyennes	62
2 . 5 .	Etude comparative de l'influence du régime alimentaire sur l'hydro- xyproline totale, libre et non dialysable (dialyse réf. 25/32)	62
2 . 5 . 1 .	Résultats	62

2 . 5 . 2 . Conclusions	63
3 . <u>DETERMINATION DES EXCRETIONS URINAIRES MOYENNES DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE ET LIBRE CHEZ LES BLESSES MEDULLAIRES P.O.A.N. - et P.O.A.N. + .</u>	67
3 . 1 . Conditions expérimentales	67
3 . 2 . Résultats	67
4 . <u>ETUDE DE L'HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE CHEZ LES SUJETS PARAPLEGIQUES ATTEINTS OU NON DE P.O.A.N. .</u>	69
4 . 1 . Conditions expérimentales	69
4 . 2 . Résultats	69
4 . 3 . Conclusions	70
5 . <u>COMPARAISON DES POURCENTAGES DES FORMES D'EXCRETION DE L'HYDROXYPRO- LINE CHEZ LES SUJETS NORMAUX ET LES SUJETS PARAPLEGIQUES .</u>	71
6 . <u>COMPARAISON DES RAPPORTS .</u>	72
6 . 1 . Etude du rapport : Hydroxyproline non dialysable / Hydroxyproline totale	72
6 . 2 . Hydroxyproline libre / Hydroxyproline non dialysable	73
6 . 3 . Hydroxyproline dialysable / Hydroxyproline non dialysable	75
DISCUSSION GÉNÉRALE	79
CONCLUSIONS	92
BIBLIOGRAPHIE	95
TABLEAUX HORS TEXTE	

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 . INTRODUCTION .

L'ostéoporose d'immobilisation constamment retrouvée chez les malades alités, provient de la destruction de la trame protéique de l'os.

Elle s'accompagne de la dépolymérisation des constituants de la substance fondamentale du tissu osseux (collagène, mucopolysaccharides) et de déminéralisation osseuse secondaire entraînant une perte calcique.

La cause principale de l'ostéoporose paraît être la perte de toute contrainte mécanique exercée sur l'os, du fait de l'immobilisation absolue. Au cours de son immobilisation, le patient peut voir survenir des para-ostéo-arthropathies neurogènes (ou P.O.A.N.) fréquentes dans les suites des paraplégies.

Ce sujet a précédemment retenu l'attention de Monsieur le Professeur J. BOURRET et de ses collaborateurs à l'hôpital Henry-Gabrielle (69230 SAINT-GENIS-LAVAL), Centre de Rééducation et de Réadaptation fonctionnelle des Hospices Civils de LYON.

Un premier travail, mené en collaboration avec le laboratoire hospitalier (Professeur A. REVOL, et Mlle G. PILONCHERY) et l'étude histologique quantitative au laboratoire de Recherche sur l'Histodynamique osseuse, Université Claude-Bernard (Professeur VIGNON, Professeur Agrégé MEUNIER) a fait l'objet de la thèse du Docteur P. MINAIRE (1973) et a permis d'établir que l'ostéoporose d'immobilisation se traduit par une diminution du volume absolu osseux provoqué par une augmentation des surfaces de résorption, mais aussi une dépression de l'ostéo-formation.

Nous avons été chargée de poursuivre ces recherches et d'étudier les différentes formes d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline

- totale
- libre
- non dialysable,

chez des sujets normaux ambulatoires (servant de témoins) et chez des malades paraplégiques hospitalisés et traités à l'hôpital Henry-Gabrielle, divisés en deux groupes :

- malades paraplégiques atteints de para-ostéo-arthropathies neurogènes (P.O.A.N.)

- malades paraplégiques indemnes de P.O.A.N., servant de témoins au regard des premiers.

Au cours de ce travail, nous avons :

- 1° - étudié les conditions de prélèvement des urines et retenu une méthode de dosage spécifique de l'hydroxyproline urinaire libre et totale ;
- 2° - mis au point une technique de dialyse pour isoler l'hydroxyproline introduite dans les peptides de haut poids moléculaire ;
- 3° - effectué chez des sujets normaux une étude de l'influence du régime alimentaire sur les taux d'excrétion urinaire des trois formes d'hydroxyproline ;
- 4° - comparé les résultats des dosages des différentes formes d'hydroxyproline urinaire chez des sujets paraplégiques indemnes de P.O.A.N. et chez ceux présentant ce type d'évolution.

2 . PROBLEME MEDICAL : les conséquences d'une immobilisation prolongée.

L'atteinte, traumatique ou non de la moëlle épinière et l'immobilisation qu'elle entraîne sont à l'origine de deux grandes complications à localisation osseuse :

- l'ostéoporose aiguë d'immobilisation,
- la formation de para-ostéo-arthropathies neurogènes.

2 . 1 . L'ostéoporose d'immobilisation est un phénomène connu de longue date, puisque pressenti dès le 18ème siècle (ANDRY - 1741). Elle a été retrouvée sur le plan radiologique dès 1921. L'histologie classique, qualitative, a enfin confirmé "l'atrophie" osseuse (ALBRIGHT et coll. - 1941, GEISER et TRUETA - 1958, LICHTWITZ et PARLIER - 1964). Elle est pratiquement toujours accompagnée d'une hypercalciurie et très fréquemment d'une hyperhydroxyprolinurie, en raison de "l'hyperresorption" osseuse. C'est tout particulièrement le cas lors de lésions médullaires complètes (MINAIRE - 1973) qui provoquent des conditions d'immobilisation parfaites et permettent des observations comparables. L'hydroxyprolinurie augmente très rapidement et atteint des valeurs maximales, dès la troisième semaine d'immobilisation pour dé-

croître ensuite régulièrement.

La calciurie s'élève plus lentement, passe par un maximum vers la douzième semaine d'immobilisation, puis décroît régulièrement. Il semble qu'en cas d'immobilisation aiguë, l'atteinte du collagène osseux soit plus précoce, précédant la destruction de la substance minérale (KLEIN et coll. - 1968).

Le travail de MINAIRE et coll. (1974) a précisé le mécanisme de cette ostéoporose aiguë : alors que la formation osseuse est très fortement déprimée, voire nulle, au début de l'immobilisation, la résorption se poursuit, et s'accroît, même transitoirement de façon significative ; puis la formation osseuse reprend, et en six mois environ, formation et résorption sont à nouveau équilibrées. L'os a toutefois perdu en moyenne 33 p. 100 de son volume trabéculaire initial pendant la période de déséquilibre. Chez le sujet jeune, cette perte est encore plus importante et entraîne parfois une hypercalcémie par insuffisance des mécanismes d'épuration rénale. La chute brutale du volume absolu osseux dépassant très largement la capacité des mécanismes habituels d'excrétion du calcium, entraîne probablement l'hypercalcémie d'immobilisation des adolescents (ALBRIGTH et coll. - 1941).

Il existe une corrélation significative entre l'hydroxyprolinurie et la résorption osseuse (LEJEUNE et coll. - 1972). Ceci a été confirmé lors de l'ostéoporose aiguë d'immobilisation chez les sujets paraplégiques (MINAIRE et coll. - 1974). Les auteurs ont cependant dû exclure six valeurs élevées d'hydroxyprolinurie, les malades en cause présentant alors des P.O.A.N. en voie de formation, associées à une ostéoporose, responsables toutes deux de l'augmentation considérable de l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline.

2 . 2 . Les para-ostéo-arthropathies neurogènes (ou P.O.A.N.) sont en effet des complications connues des lésions de la moëlle épinière. Il s'agit d'ossifications para-articulaires accompagnées d'un syndrome inflammatoire, mais dont l'étiologie est encore inconnue (GUILLAUMAT et coll. - 1976).

Elles ont été décrites dès 1919 (DEJERINE et CEILLIER - 1918) et retrouvées ensuite dans d'autres affections du système nerveux central : comas oxycarbonés, traumatismes crâniens, encéphalopathies, hémiplegies (ALEX - 1959). Elles sont retrouvées chez 30 à 55 p. 100 des pa-

raplégiques. Il existe une prépondérance masculine accompagnée d'une plus grande fréquence chez les sujets jeunes, de moins de 50 ans et surtout de moins de 30 ans. La formation des P.O.A.N. est généralement précoce, dès la troisième semaine après la lésion médullaire, mais dans certains cas plus rares, elle peut attendre le sixième mois et plus. Les articulations proximales sont atteintes : hanches, genoux, épaules, coudes. La P.O.A.N. est indépendante du squelette, en dehors de la synoviale. Sur le plan microscopique, il s'agit d'authentiques ossifications et non de calcifications (DEJERINE et CEILLIER - 1918). Cet os est semblable à celui du squelette, sa formation correspond donc à un processus différent de celui décrit dans la myosite ossifiante.

Ces para-arthropathies sont de découverte clinique. En 24 heures, il apparaît une tuméfaction para-articulaire, très vite accompagnée d'une limitation de l'amplitude articulaire. Les premiers signes radiologiques d'ossification des parties molles n'apparaîtront que huit jours plus tard. La P.O.A.N. peut rester de petite taille, en limitant peu ou pas du tout l'amplitude articulaire. Au contraire, l'évolution est parfois "sarcomateuse", explosive, et un "enraidissement" très important de l'articulation se produit.

Sur le plan biologique, les phosphatases alcalines s'élèvent et constituent le test le plus fidèle de la présence des P.O.A.N.. Cette élévation se produit vers le septième ou le huitième jour, atteint parfois jusqu'à 25 ou 30 unités Bodansky pour 100 ml. Les phosphatases alcalines restent élevées jusqu'à maturation de la P.O.A.N. : lorsque celle-ci cesse de croître dans les parties molles, c'est-à-dire à l'intérieur des tissus conjonctif et musculaire périarticulaires, les phosphatases alcalines restent stables. Il importe bien sûr, d'éliminer toute maladie hépatique intercurrente, susceptible de retentir sur l'activité phosphatasique alcaline du sérum.

L'hydroxyprolinurie totale augmente également lors de l'apparition de P.O.A.N., mais cette élévation survient sur des chiffres déjà importants du fait de la destruction osseuse. De plus, les taux d'excrétion sont très variables d'un jour à l'autre, et les résultats sont difficiles à exploiter (CHANTRAINE - 1971, MINAIRE et coll. - 1974).

En fait, la biologie n'est pas utile au diagnostic de la P.O.A.N., mais pourrait rendre service dans la surveillance de sa maturation. Il est en effet capital de savoir si la P.O.A.N. n'est plus évolutive, pour reprendre une rééducation plus intensive, ou envisager une intervention chirurgicale de libération, l'intervention chirurgicale ou la reprise trop intensive de rééducation sur une P.O.A.N. encore évolutive exposant le malade à une récurrence certaine et catastrophique.

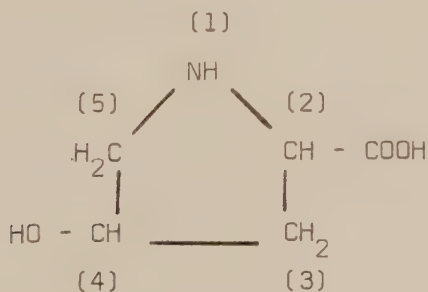
La radiographie n'est d'aucun secours pour apprécier cette maturation. La scintigraphie au Technetium 99m n'a de valeur que si elle est quantitative : par ailleurs sa réalisation est très délicate.

Seules les phosphatases alcalines constituent un test fiable de maturation. Mais la seule évaluation de leur activité est insuffisante, en raison de l'existence de résultats faussement positifs, toutefois assez rares.

L'augmentation de l'hydroxyprolinurie totale au cours des P.O.A.N. précédemment constatée nous a paru suffisamment démonstrative et importante pour nous conduire à rechercher les formes de l'hydroxyproline urinaire responsables de cette élévation.

3 . GENERALITES SUR L'HYDROXYPROLINE .

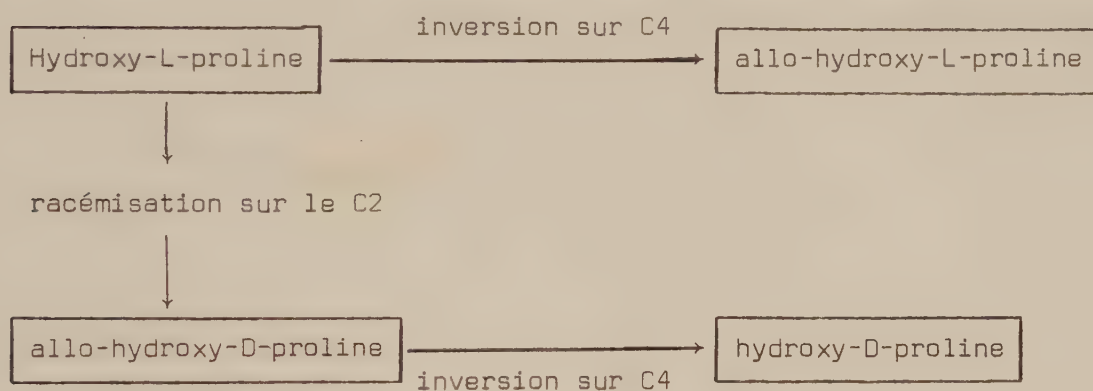
L'hydroxyproline est un α - amino-acide particulier, à structure hétérocyclique dont le groupement α - aminé est intégré dans l'hétérocycle. L'hydroxyproline, comme la proline est un imino-acide. Lorsque l'imine et le carboxyle sont bloqués dans une chaîne peptidique, le radical de l'hydroxyproline est neutre, non ionique et polaire (JAVILLIER et coll. - 1959).



Hydroxyproline

Classée avec réticence dans le groupe des "amino-acides ordinaires", l'hydroxyproline n'est pas un constituant ordinaire des protéines. Elle n'est rencontrée en effet que dans la gélatine, protéine très courante renfermant 14 pour 100 d'hydroxyproline.

C'est en 1902 que FISCHER isola l'hydroxyproline en partant d'un hydrolysate acide de gélatine. Par réduction de cette nouvelle substance par le phosphore et l'acide iodhydrique, il obtint la proline. La localisation du groupement hydroxyle fut difficile à préciser. C'est seulement en 1913 que BREWSTER montra sans équivoque que l'hydroxyle est situé en position 4. L'hydroxyproline est donc l'acide 4 - Hydroxy - 2 - Pyrrolidine - carboxylique. Cette structure entraîne une stéréo-isomérisie due aux carbones 2 et 4 asymétriques, qui permet de prévoir 4 formes actives.



La forme naturelle correspond à l'hydroxy-L-proline.

3 . 1 . Répartition de l'hydroxyproline dans l'alimentation.

L'hydroxyproline est rencontrée principalement dans le tissu conjonctif et nous n'avons pu retrouver de documentation donnant la composition des aliments en hydroxyproline.

Nous pouvons cependant affirmer que la viande et surtout les bas morceaux, les desserts industriels (gelées, flans, tartes et glaces), les confitures industrielles, certains fromages, la charcuterie (et surtout celle renfermant de la gélatine), certaines confiseries, contiennent une grande quantité soit de tissu conjonctif, soit de gélatine et par conséquent d'hydroxyproline. Cet apport alimentaire

banal d'hydroxyproline constitue une gêne importante dans l'interprétation des dosages de l'hydroxyprolinurie totale et libre chez l'homme.

3 . 2 . Répartition de l'hydroxyproline dans les tissus.

Dans l'organisme, l'hydroxyproline est presque totalement incluse dans le collagène où elle représente environ 10 à 14 pour 100 de l'ensemble des amino-acides.

L'Elastine en renferme environ 2 pour 100.

Le collagène est une scléroprotéine élément du tissu conjonctif retrouvé dans les os, les dents, les cartilages et les tendons. Ces scléroprotéines contiennent une partie glucidique et sont actuellement classées parmi les glycoprotéines.

La composition en amino-acides du collagène est assez bien connue pour un certain nombre de tissus. Le collagène de l'os humain renferme par exemple :

Glycine	34 pour 100
Proline	13 pour 100
Hydroxyproline	10-14 pour 100
Alanine	12 pour 100
Acide glutamique	8 pour 100
Acide aspartique	5 pour 100
Hydroxylysine	> 1 pour 100

Une modification de structure obtenue par ébullition avec un acide dilué, transforme le collagène en gélatine.

Cependant, la résistance de ces scléroprotéines aux agents chimiques et aux enzymes est grande, rendant leur attaque difficile et souvent incomplète.

3 . 3 . Métabolisme de l'hydroxyproline.

La proline absorbée au niveau du tube digestif est utilisée pour la synthèse du précurseur du collagène le "procollagène". L'acide une fois incorporé dans une chaîne peptidique est hydroxylé en hydroxyproline entrant dans la composition des chaînes hélicoïdales

du collagène (BERG et coll. - 1973) dit "collagène soluble" ou "tropocollagène". Celui-ci est transformé en "collagène insoluble" par la création de liaisons entre les fibres du "collagène-soluble".

3 . 3 . 1 . Structure du collagène.

Le collagène, observé au microscope électronique montre la présence de fibres elles-mêmes subdivisées en fibrilles.

Dans l'enchaînement des amino-acides, la séquence la plus fréquente est :

Glycine - Hydroxyproline - Proline.

L'étude aux rayons X a montré que cette structure pouvait correspondre à une disposition spatiale de trois chaînes peptidiques disposées en hélice, formant un cordage enroulé (TROPOCOLLAGENE).

Entre les chaînes principales, il existe des liaisons ester reliant les groupes carboxyliques des acides dicarboxyliques et le groupement - OH de l'hydroxyproline (ou de l'hydroxylysine) conduisant à du collagène de plus en plus insoluble.

3 . 3 . 2 . Biosynthèse du collagène.

Les théories s'opposent encore pour savoir à quel stade de la synthèse du collagène intervient l'hydroxylation de la proline.

Selon KOSFKY et UDENFRIEND (1963), l'hydroxylation de la proline s'effectue alors qu'elle est déjà incorporée dans la protéine détachée du ribosome (étude faite à l'aide de proline marquée au ^{14}C).

D'autres faits expérimentaux, cependant, sont en faveur de l'hydroxylation de la proline au niveau du peptide encore fixé sur le ribosome, avant la libération de ce dernier (MANNING et MEISTER - 1966).

Pour concilier ces résultats opposés, UDENFRIEND (1966) a proposé l'hypothèse suivante : la proline activée et convertie en prolyl-s-RNA s'attache au ribosome et est incorporée dans un peptide lui-même encore lié au ribosome ; quand ce peptide atteint une certai-

ne taille et possède les séquences nécessaires pour devenir un substrat de la protocollagène hydroxylase, un certain nombre de résidus prolyl sont hydroxylés en hydroxyprolyl (JAVILLIER et coll. - 1972).

Le désaccord au niveau de l'hydroxylation de la proline au cours de la biosynthèse protéique a pour conséquence une incertitude sur la nature exacte du substrat de la protocollagène hydroxylase. Il pourrait être représenté par le protocollagène (poids moléculaire > 100 000) dépourvu d'hydroxyproline.

Au contraire, le substrat pourrait être un peptide de poids moléculaire inférieur à 10 000, l'hydroxylation ayant lieu au fur et à mesure que la chaîne peptidique s'allonge.

Il faut noter qu'un polymère (Pro-Gly-Pro)_n s'avère un substrat d'autant meilleur que son poids moléculaire est plus élevé. La protocollagène hydroxylase, requiert pour être active la présence d'oxygène, d'acide ascorbique, de Fe ⁺⁺ et d' α - cétooglutarate.

Une nouvelle hypothèse avancée par LOUISOT (1975) distingue dans la biosynthèse du collagène deux grandes phases en fonction de leur localisation subcellulaire différente.

- La phase intra-fibroblastique
 - . biosynthèse des précurseurs polypeptidiques
 - . restriction des précurseurs
 - . hydroxylation des résidus lysyl et prolyl
 - . glycosylation.
- La phase extra-fibroblastique
 - . pontages inter-moléculaires donnant naissance aux fibres.

L'hydroxylation des résidus prolyl est réalisée par la proline-hydroxylase.

- Cette hydroxylation de la proline porte sur des résidus inclus dans des séquences peptidiques et non pas sur la proline libre.

La séquence environnementale préférentielle pour l'enzyme est :

- X - Y - PRO - GLY -

X = GLY, ARG ou LYS

Y = LEU - PRO - ALA ou GLU

- Cette hydroxylation est indispensable à l'évolution biosynthétique ultérieure du collagène, puisque les peptides non hydroxylés sont secondairement dégradés.

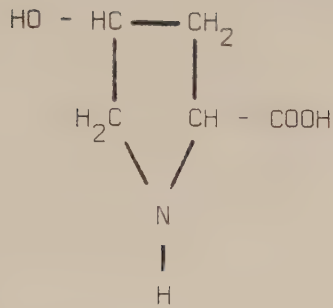
Le mécanisme d'action de l'enzyme est bien connu et son affinité pour le substrat est d'autant plus grande que le poids moléculaire de celui-ci est plus élevé.

Au cours de la phase extra-fibroblastique, le procollagène amputé de ses peptides de stabilisation, hydroxylé et glycolysé sort du fibroblaste : c'est le tropocollagène. C'est alors que se constituent les pontages inter-moléculaires, qui vont donner naissance aux fibres.

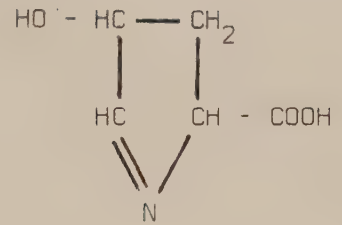
3 . 3 . 3 . Catabolisme de l'hydroxyproline et forme d'excrétion.

Lors du catabolisme du "collagène soluble" et "insoluble", l'hydroxyproline est libérée sous forme de peptides qui ne peuvent plus être réutilisés pour la formation des fibres protéïques. Pour certains auteurs, et nous le verrons plus loin, ces peptides constituent la fraction dialysable de l'hydroxyproline urinaire.

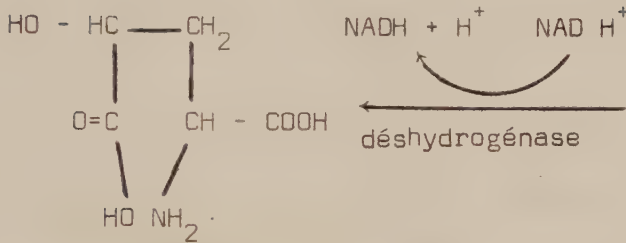
L'hydroxyproline est transformée transitoirement en un dérivé de l'acide-glutamique qui donne ensuite naissance aux acides glyoxalique et pyruvique.



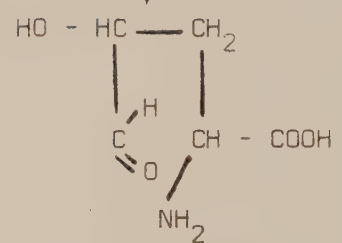
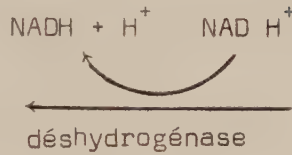
4-Hydroxy-1-Proline



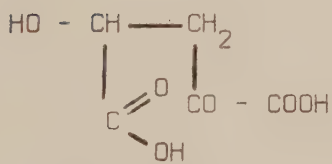
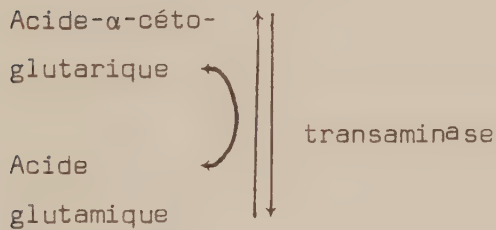
Acide Δ_5 -pyrroline-4
Hydroxy-2-Carboxylique



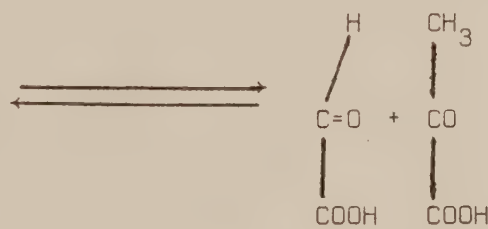
Acide
 γ -Hydroxyglutamique



δ -Semiald\`{e}hyde
 γ -Hydroxyglutamique



Acide α -c\`{e}to
 γ -hydroxyglutarique

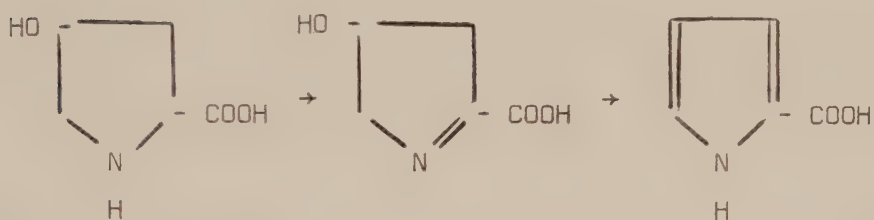


Acide
glyoxalique
Acide
pyruvique

Les étapes de ce catabolisme sont réversibles, à l'exception des deux étapes oxydatives.

Le métabolisme urinaire majeur de la 4-Hydroxy-L-Proline est l'acide pyrrole-2-carboxylique (JAVILLIER et coll. - 1972).

Il est vraisemblable que la formation de cet acide implique une transformation initiale de la 4-Hydroxy-L-Proline en acide Δ_1 -pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylique mais le mécanisme de cette transformation n'est pas encore élucidé.



Hydroxyproline

Acide Δ_1 - pyrroline
4 - Hydroxy - 2 -
Carboxylique

Acide pyrrole -
2 - carboxylique

4 . ORIGINE ET NATURE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE LIBRE ET TOTALE .

4 . 1 . Nature de l'hydroxyproline urinaire.

L'hydroxyproline urinaire "totale" comprend :

- l'hydroxyproline libre
- des peptides à hydroxyproline représentant 95 à 97 p. 100 du total, correspondant à l'hydroxyproline conjuguée.

Ces peptides à hydroxyproline sont de taille très variable et peuvent être divisés en :

- peptides à hydroxyproline dialysables
- peptides à hydroxyproline non dialysables de masses moléculaires supérieures ou égales à 6 000 - 8 000 (représentant environ 9 p. 100 de l'hydroxyproline totale). (DREUX - 1970)

MEILMAN (1963) a d'abord isolé de l'urine à partir des peptides à hydroxyproline :

- un dipeptide : Proline-Hydroxyproline (60 p. 100 environ)
- un tripeptide : Acide glutamique-Hydroxyproline - Acide glutamique (15 p. 100)
- un tripeptide : Glycine-Proline-Hydroxyproline (15 p. 100).

Cette étude poursuivie par DREUX et DAKKAK (1972) en chromatographie d'exclusion sur Sephadex G 10 après isolement des peptides sur résine échangeuse d'ions a montré la présence de trois fractions (dans les urines d'individus normaux)

- . la fraction 1 représente 10 p. 100 environ des peptides
- . la fraction 2 représente 75 p. 100 environ des peptides
- . la fraction 3 représente 15 p. 100 environ des peptides.

La composition de la fraction 1 ne semble pas avoir été étudiée.

L'analyse de la fraction 2 a montré qu'elle se composait de 4 peptides renfermant au total 14 amino-acides ; les plus importants quantitativement sont : glycine, proline, hydroxyproline, acide aspartique ; on trouve également sérine, alanine, phenylalanine, cystine, leucine et une faible proportion de lysine, thréonine, isoleucine, ornithine, histidine. L'un de ces peptides est sans doute le dipep-

tide dominant Hydroxyproline-Proline. Les acides aminés caractérisés sont ceux qui dominent dans le collagène (hormis l'acide glutamique et la cystine). Cette fraction 2 contient aussi l'hydroxyproline libre ; elle correspondrait aux peptides dialysables.

La fraction 3 ne semble contenir qu'un seul peptide composé de 8 amino-acides : cette fraction, nettement augmentée dans la maladie de Paget et les métastases osseuses, correspondrait aux peptides non dialysables.

4 . 2 . Origine et signification physiologique.

La majorité des auteurs est d'accord sur le fait que l'hydroxyproline urinaire totale provient pour la plus grande partie de la dégradation du collagène (hydroxyproline liée) et pour la partie restante (hydroxyproline libre) de l'alimentation, hypothèse basée sur les observations suivantes :

- même avec un régime sans collagène, on observe toujours une excrétion urinaire d'hydroxyproline.
- 95 à 97 p. 100 de l'hydroxyproline totale dosée dans les urines est sous forme de peptides et les 3 à 5 p. 100 restant représentent la forme libre (avec un régime sans collagène)
- un régime chargé en collagène conduit à une augmentation importante de l'hydroxyprolinurie totale associée à une augmentation modérée de l'hydroxyprolinurie libre.

Ceci s'explique par le fait que l'équilibre formation - résorption osseuse maintenu par l'apport alimentaire est alors rompu. Le processus de formation augmentant considérablement, il entraîne pour que l'équilibre soit maintenu, une plus rapide dégradation du collagène, provoquant l'élévation du taux d'hydroxyprolinurie totale.

- L'ingestion d'hydroxyproline libre se traduit par l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'Imino-Acide exclusivement sous forme libre (DREUX - 1970).

4 . 3 . Variations physiopathologiques de l'hydroxyproline urinaire totale.

Les auteurs s'accordent pour considérer que chez un sujet normal adulte, le taux d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline totale est de 20 ± 5 mg par 24 heures, et que l'apparition de taux supérieurs à 50 mg par 24 heures doit être retenue comme pathologique chez des individus soumis à un régime strict sans collagène.

De nombreux auteurs ont montré qu'il existait chez l'homme sain de grandes variations des formes d'excrétion de l'hydroxyproline urinaire, selon l'âge et l'alimentation des sujets, qu'elles étaient également retrouvées chez des malades en fonction du degré de l'atteinte osseuse et endocrinienne.

- Chez le nouveau-né, la fraction libre peut atteindre 40 à 45 p. 100 de l'hydroxyproline totale (DREUX - 1970).
- L'hydroxyprolinurie totale s'élève au cours de l'enfance et s'accroît encore aux périodes de croissance maximale (FOURMAN et ROYER - 1970).
- Le régime alimentaire et surtout l'apport de grandes quantités de gélatine provoquent des variations considérables de l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline totale.
- En pathologie humaine, l'accroissement d'excrétion d'hydroxyproline a été noté pour la première fois au cours du syndrome de MARFAN. Il a été constaté dans la maladie de Paget, l'ostéoporose, l'ostéomalacie, les cancers avec métastases osseuses, et les P.O.A.N., ainsi que dans certaines maladies endocriniennes comme l'hyperthyroïdisme et l'hyperparathyroïdisme (DREUX - 1972).

5 . ORIGINE ET ISOLEMENT DES PEPTIDES URINAIRES A HYDROXYPROLINE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE NON DIALYSABLES .

5 . 1 . Travaux antérieurs.

En 1956, ZIFF isole de l'urine des sujets normaux des peptides à hydroxyproline non dialysables représentant environ 9 p. 100 de l'hydroxyprolinurie totale.

Les travaux poursuivis par KRANE (1970) et HADDAD (1970) chez des sujets atteints de maladies osseuse (maladie de Paget), endocrinienne (hyperparathyroïdisme), et ANASUYA (1970) au cours des maladies osseuses professionnelles (fluorose) ont permis de mettre en évidence, chaque fois une augmentation de l'excrétion urinaire des polypeptides à hydroxyproline de haut poids moléculaire, non dialysables.

Ces chercheurs se sont penchés sur le fractionnement, l'isolement, l'identification et la signification de ces peptides urinaires à hydroxyproline dont les masses moléculaires sont comprises entre 4 500 et 10 000.

Ils ont mis en évidence :

- que l'ablation chirurgicale d'un adénome de la parathyroïde chez des hyperparathyroïdiens s'accompagne d'une chute rapide de l'hydroxyprolinurie totale, tandis que le pourcentage de la fraction polypeptidique de masse moléculaire élevée non dialysable est triplé ou quadruplé.
- que les urines des sujets atteints de maladie de Paget contiennent de très grandes quantités de peptides à hydroxyproline non dialysables, l'administration à ces sujets de thyrocalcitonine ayant pour conséquence une chute importante du taux d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline avec une diminution parallèle de la fraction dialysable et non dialysable.

Des études ultérieures à l'aide de radiotraceurs (proline et hydroxyproline marquées au ^{14}C) réalisées par KRANE (1970) révèlent que les peptides à hydroxyproline non dialysables pourraient provenir aussi bien du collagène récemment synthétisé et rapidement dégradé, que de fragments nouvellement synthétisés, mais non encore incorporés dans la trame du collagène.

KRANE (1970) et HADDAD (1970) en ont conclu que les fragments polypeptidiques urinaires de haut poids moléculaire contenant de l'hydroxyproline sont en corrélation directe avec la formation de l'os.

5 . 2 . But de notre recherche.

Nous avons d'abord précisé certains aspects analytiques (conditions de prélèvement - critères de qualité) des méthodes d'évaluation retenues et recherché l'influence des apports alimentaires sur les différentes formes d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline.

Si l'on avait considéré au départ le rôle de l'alimentation comme de peu d'importance dans l'étude des formes d'élimination de l'hydroxyproline, ce n'est plus le cas depuis une dizaine d'années. Les variations de l'hydroxyproline d'origine alimentaire sont si importantes, qu'elles sont à l'origine d'une certaine désaffection vis-à-vis de cet examen. Nous avons cherché à situer l'importance de l'alimentation des patients dans le cadre de l'étude entreprise afin de nous mettre à l'abri d'erreurs dans l'interprétation de nos résultats.

En regard des travaux précédents, l'évaluation dans l'urine de la fraction peptidique à hydroxyproline de haut poids moléculaire, apparaît comme un moyen d'approche de l'ostéoformation. Aussi nous a-t-il paru important de poursuivre les travaux entrepris sur les formes d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Henry Gabrielle en mesurant en plus de l'hydroxyproline libre et totale, l'hydroxyproline non dialysable chez les sujets porteurs d'ostéomes neurogènes et d'en suivre l'évolution dans le temps, afin de préciser les valeurs du paramètre pour suivre l'apparition et la maturation d'une P.O.A.N.

Nous avons comparé les résultats obtenus chez des paraplégiques P.O.A.N. positifs à ceux établis chez des témoins normaux et des paraplégiques P.O.A.N. négatifs afin de vérifier si l'étude de ce paramètre permettrait de réaliser un dépistage des P.O.A.N. en formation.

Ceci nous a conduit à retenir deux directions principales pour cette recherche :

- l'étude de l'influence de l'alimentation sur l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable, réalisée chez des sujets normaux appartenant au personnel du Laboratoire ;
- l'étude de la fraction peptidique non dialysable chez les blessés

médullaires présentant ou non une P.O.A.N. comparativement aux autres formes d'excrétion de l'hydroxyproline.

6 . DONNEES ANALYTIQUES .

Nous exposerons successivement les différentes méthodes d'isolement d'identification et de dosage de l'hydroxyproline urinaire et sanguine sous leurs formes libre et totale.

6 . 1 . Isolement et séparation de l'hydroxyproline par chromatographie de partage ou électrophorèse.

La chromatographie bidimensionnelle sur papier, l'électro-chromatographie (papier ou couche mince) et l'électrophorèse à haute tension sont des techniques élaborées pour la recherche des amino-acides. Elles ne permettent qu'une estimation de l'hydroxyproline libre urinaire ou une séparation des peptides à hydroxyproline. La chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatmann (SPINELLA - 1969) ou en couche mince sur gel de silice (PATAKI - 1967 - KRAFFCZYK et coll. - 1970) permettent la mise en évidence de la proline et de l'hydroxyproline qui sont révélées par la ninhydrine ; ces deux amino-acides apparaissent sous forme de taches jaunes, tandis que les autres amino-acides présentent une coloration violette.

AMBERT et coll. (1966) exposent un procédé de séparation des amino-acides par électro-chromatographie et chromatographie en couche mince sur gel de silice, en choisissant pour la révélation de la proline et de l'hydroxyproline un réactif à l'isatine qui donne respectivement pour ces deux amino-acides des taches bleues et bleu-vert.

Ces techniques sont relatées dans le rapport publié à l'issue des Journées de l'Internat en Pharmacie de Grenoble, consacrées aux amino-acidopathies (Grenoble - 1972).

MOORE et STEIN (1951) ont proposé une méthode actuellement universellement appliquée pour la séparation d'un mélange d' amino-acides sur une colonne de résine échangeuse d'ions.

6 . 2 . Dosage de l'Hydroxyproline urinaire.

L'hydroxyproline urinaire totale ou libre est le plus couramment dosée par colorimétrie.

6 . 2 . 1 . Dosage colorimétrique manuel.

Le dosage colorimétrique de l'hydroxyproline totale nécessite une hydrolyse préalable des urines pour libérer l'hydroxyproline engagée dans les liaisons peptidiques.

La mesure comporte l'oxydation de l'hydroxyproline libérée par l'hydrolyse en acide pyrrole-2-carboxylique, lui-même décarboxylé en pyrrole. Le mélange final est formé des deux composants dont le rapport varie en fonction des conditions opératoires. Cette réaction est arrêtée par l'addition d'un réducteur ou d'un acide.

Les dérivés pyrroliques ainsi formés sont mis en évidence par la réaction colorée rose qu'ils donnent avec le réactif d'Ehrlich au para-diméthyl-amino-benzaldehyde. Cette réaction est conduite en milieu hydro-alcoolique acide et présente un maximum d'absorption vers 560 nm.

Le dosage de l'hydroxyproline libre utilise la même réaction, qui est appliquée directement à l'urine, ou à l'extrait urinaire privé des peptides à hydroxyproline.

6 . 2 . 1 . 1 . Hydrolyse.

La libération de l'hydroxyproline à partir de peptides peut être réalisée en additionnant l'urine d'un volume égal d'acide chlorhydrique 6N ou 12N ; l'hydrolyse est conduite à l'autoclave en ampoules scellées selon des modalités différentes suivant les auteurs.

- PAREKH et JUNG (1970) maintiennent les échantillons 2 heures à 124° C.

- PROCKOP et UDENFRIEND (1960), suivis par WOESSNER (1961), KLEIN (1970), DREUX (1970) hydrolysent 3 heures à 120 -

130° C.

- FIRSCHEIN et SHILL (1966), suivis par BOREL (1967), HADDAD et coll. (1970), RAMAMURTHY et coll. (1971), BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1975), préconisent une nuit et même jusqu'à 24 heures à une température de 95° à 110° C.

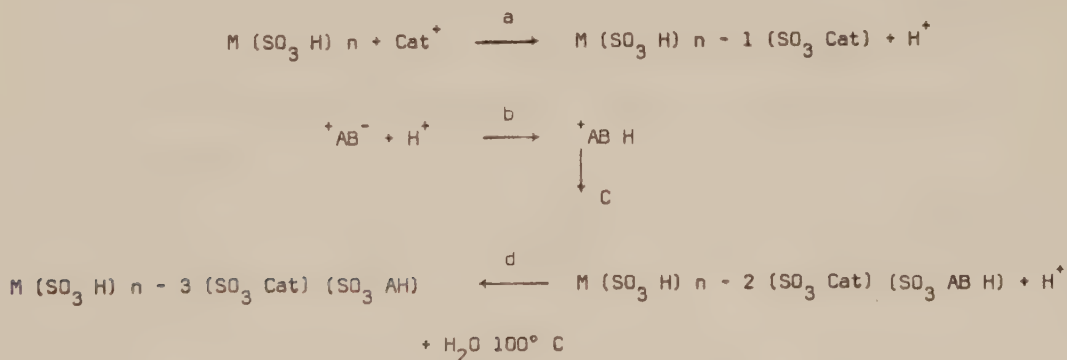
Récemment les Laboratoires ORGANON-TEKNIKA ont mis au point une technique d'hydrolyse ne nécessitant plus l'emploi d'acide chlorhydrique.

L'hydroxyproline contenue dans l'urine est fixée sur une résine amberlite CG 120 sous forme cationique dans des tubes spéciaux et autoclavés 3 heures à 120° C (GOVERDE, HIOCO).

La résine amberlite CG 120 est une résine type polystyrène sulfonée fortement acide et peut être représentée de la façon suivante : $R - SO_3 - H^+$

Elle est utilisée sous forme de granulés, présentant ainsi une plus grande surface que les résines sphériques de même granulométrie.

Le mécanisme de l'adsorption des composés urinaires sur les résines polystyrène sulfonées et l'hydrolyse ultérieure des peptides peut être représentée de la manière suivante :



a : fixation des cations (Cat^+), formation d'ions hydrogène, diminution du pH ;

b : protonation des peptides amphotères ;

c : fixation des substances peptidiques sur la résine ;

d : hydrolyse catalysée par la résine.

M : matrice de la résine ;

${}^+AB^-$: représentation schématique d'un (di) peptide.

L'hydrolyse, catalysée par la résine est extrêmement douce. Les inter-actions sucre-acide aminé sont réduites au minimum du fait de la fixation des acides aminés sur la résine, tandis que les sucres neutres restent en solution.

Il n'y a donc pas de formation d'humines.

Bien que la couleur de la résine fonce lors de l'hydrolyse, les surnageants sont totalement exempts d'humines après centrifugation des suspensions de résine éluée.

Ceci peut être considéré comme un très grand avantage sur l'hydrolyse par les acides minéraux.

6 . 2 . 1 . 2 . Purification.

Après hydrolyse acide des échantillons, il est nécessaire d'effectuer soit une purification de l'hydrolysate par différents traitements, soit une extraction de l'hydroxyproline pour séparer celle-ci des substances chromogènes parasites pouvant interférer dans la réaction colorée finale.

- PROCKOP et UDENFRIEND (1960), RAMAMURTHY et coll. (1971) proposent une élimination des chromogènes par passage sur un mélange charbon + résine (résine échangeuse de cations AG 1 X 8 + Norit A).
- CLEARY et SAUNDERS (1974) préconisent un passage sur résine AG 11 A 8 échangeuse de cations (résine dessalante). L'hydroxyproline éluée par de l'eau est ensuite soumise à l'oxydation.
- FIRSCHEIN (1966) suivi par KLEIN (1970) réalise une chromatographie sur DOWEX 50W - X8 200 - 400 mesh échangeuse de cations.
- Selon la technique de GOVERDE et VEENKAMP (1972) que nous avons retenue, l'hydrolyse et la purification sont réalisées en parallèle au cours de la même opération.

Les éluats ainsi recueillis permettent le dosage colorimétrique de l'hydroxyproline purifiée et libérée des liaisons

peptidiques.

6 . 2 . 1 . 3 . Neutralisation.

Après hydrolyse acide FIRSCHEIN (1968), SWITZER et SUMMER (1971) neutralisent l'hydrolysate pour revenir à un pH facilitant l'oxydation.

Pour GOVERDE, l'élution réalisée par l'hydroxyde de sodium doit être suivie d'une neutralisation et retour à un pH légèrement acide.

6 . 2 . 1 . 4 . Oxydation.

Les premières techniques publiées par NEUMAN et LOGAN (1950) suivies par FILLIAT et coll. (1966) puis par BOREL (1967) proposaient un oxydant doux, le peroxyde d'hydrogène. Depuis, il a été montré que selon cette technique, l'oxydation n'était pas complète.

Tous les auteurs s'accordent aujourd'hui pour reconnaître l'intérêt de la chloramine T qui dans des conditions précises de pH, de température et de temps, fournit les meilleurs résultats.

Le produit de la réaction est composé d'Acide-pyrrole-2-carboxylique et de pyrrole en proportion variable selon les conditions opératoires.

La réaction d'oxydation doit être arrêtée soit par addition d'un réducteur comme le Thiosulfate de sodium (PROCKOP - 1960, SWITZER - 1971, BLUMENKRANTZ - 1975) ou le sulfite de sodium (DREUX - 1970), soit par un acide fort comme l'acide sulfurique (BOREL - 1967) ou plus fréquemment, l'acide perchlorique (WOESSNER - 1961, GOVERDE et VEENKAMP - 1972).

6 . 2 . 1 . 5 . Extraction des dérivés d'oxydation.

Cette extraction a pour but d'éliminer les composés biologiques susceptibles d'interférer lors du dosage colorimétrique des dérivés pyrroliques formés,

- soit en présentant une coloration naturelle gênante,
- soit en empêchant la formation du chromogène
- soit en développant une coloration identique ou différente, mais gênante en réagissant avec le para-diméthyl-amino-benzaldehyde.

Parmi les substances interférentes connues, on peut citer :

- les autres amino-acides (NEUMAN et LOGAN - 1950, PROCKOP - 1960, WOESSNER - 1961, KLEIN - 1970).
- l'urée (JONES - 1970, CLEARY - 1974).
- l'humine (RAMAMURTHY - 1971, CLEARY - 1974).
- l'acide urique (JONES - 1970).
- les sels et pigments biliaires (CLEARY - 1974).
- les N-Acetyl-osamines et les Acides sialiques pour l'hydroxyproline libre (BOREL - 1967).

PROCKOP et UDENFRIEND (1960) effectuent une double extraction par le toluène, la première réalisée après une légère oxydation à température ordinaire, pour éliminer les impuretés, la seconde, après une oxydation plus poussée à chaud, pour extraire le pyrrole formé.

NEUMAN et LOGAN extraient l'acide pyrrole-2-carboxylique par l'éther, solution préconisée aussi par FILLIAT et coll. (1966).

Cependant, WOESSNER (1961) et DREUX (1970) ont montré que ces procédés d'isolement allongent la méthode de dosage et que les taux urinaires d'hydroxyproline, dans les conditions expérimentales habituelles, n'étaient pas influencés par des dérivés du tryptophane de la tyrosine et de l'urée, comme certains auteurs l'avaient d'abord pensé.

6 . 2 . 1 . 6 . Réaction colorée au para-diméthyl-amino-benzaldehyde.

Les différentes méthodes décrites se différencient par les concentrations de réactif, les températures de développement de la réaction et le temps retenu pour la lecture de l'absorbance.

Elles peuvent se résumer ainsi :

le développement de la coloration est conduit

- soit à 60 - 80° C pendant une vingtaine de minutes, suivi d'un refroidissement sous eau courante et mesure de l'absorbance après 30 minutes à température ambiante ; la coloration obtenue est stable pendant une heure ;
- soit une nuit (12 à 18 heures) à la température du Laboratoire (BERGMAN et LOXLEY - 1963).

6 . 2 . 2 . Dosage automatique sur auto-analyseur.

Depuis la publication de GRANT en 1964, de nombreux auteurs ont fait part de leur expérience sur ce sujet (DREUX et LEYMARIE - 1968, PENNOCK et coll. - 1970, SEYMOUR et JACKSON - 1974, BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN - 1974, BURKHARDT et coll. - 1974, DELFOSSE et coll. - 1975).

Après hydrolyse acide et passage sur résine des urines (DAKKAK et DREUX - 1976), l'oxydation et la réaction colorée, conduites dans les mêmes conditions que pour la méthode manuelle, sont effectuées sur un auto-analyseur.

L'hydroxyproline totale et l'hydroxyproline libre sont ainsi dosées. Cette technique présente de nombreux avantages, comme la possibilité de réaliser de grandes séries de dosages, avec une meilleure reproductibilité.

Notre expérience est encore trop réduite pour faire part de nos résultats et porter un jugement à son sujet.

6 . 2 . 3 . Chromatographie en phase gazeuse.

Citons pour mémoire la possibilité de faire le dosage de l'hydro-

xyproline comme celui des autres amino-acides par chromatographie en phase gazeuse.

Il s'agit d'une méthode polyvalente de dosage des amino-acides. Elle a l'avantage d'être assez rapide et sensible, mais son développement est freiné par les difficultés de préparation des composés à injecter. Les acides aminés sont en effet peu volatils et très polaires (BARBIER - 1972, MEE - 1973, GIBBS et coll. - 1974, MOSS et LAMBERT - 1974).

6 . 3 . Dosage de l'hydroxyproline plasmatique.

L'hydroxyproline plasmatique est présente sous les deux formes libre et peptidique.

Celles-ci peuvent être dosées :

- par des macrométhodes manuelles (DUBOVSKY et MEYER - 1975) après déprotéïnisation. L'échantillon est filtré sur colonne de Bio-gel P 2, l'éluat recueilli est hydrolysé et le dosage colorimétrique est poursuivi comme pour les urines ;
- par microméthode manuelle (DABEV et STRUCK - 1971), après extraction par l'éthanol, évaporation à sec ; le résidu est ensuite dissous dans un tampon pH 6 pour la coloration ;
- par une méthode automatique sur auto-analyseur pour l'hydroxyproline libre plasmatique (TEPPER et DE VOS - 1975) dans les mêmes conditions que précédemment, sans hydrolyse préalable.

Les taux plasmatiques sont faibles chez les sujets normaux : environ $2,5 \pm 0,5$ mg/l.

Notons que le dosage plasmatique est intéressant dans le diagnostic des amino-acidopathies congénitales concernant le métabolisme de l'hydroxyproline. PELKONEN et KIVIRIKKO (1970) citent un cas d'hydroxyprolinémie congénitale où le taux d'hydroxyproline libre du plasma atteint des quantités considérables : 20,6 mg/l.

6 . 4 . Etude in vivo à l'aide de radio-traceurs .

L'introduction per os dans l'organisme humain de Proline et d'Hydroxyproline marquées au ^{14}C (KRANE et coll. - 1970) a permis de suivre leur destinée in vivo et a mis en évidence que les peptides à hydroxyproline non dialysables de l'urine étaient liés à l'ostéosynthèse.

ROJKIND et GONZALEZ (1974) ainsi que BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1975) ont mis au point des techniques de détermination des activités spécifiques de la proline ^{14}C et de l'hydroxyproline ^{14}C dans le collagène et les protéines non collagéniques.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous allons exposer successivement les différents problèmes que nous avons rencontrés au cours de notre étude et les solutions que nous proposons pour les résoudre.

La méthode de FIRSCHEIN (1966) que nous avons essayée au début de cette étude a dû être rapidement abandonnée. En effet, l'hydrolyse de l'urine en présence d'acide chlorhydrique concentré dans des ampoules scellées est susceptible d'amener des accidents lors de l'autoclavage et, de toute façon, entraîne un brunissement des urines néfaste pour la lecture de la réaction colorée finale.

Nous avons adopté la méthode de GOVERDE et VEENKAMP (1972) utilisée par de nombreux auteurs : BURKHARDT et coll. (1973), WALSER et SCHOENENBERGER (1974), NOBBS et coll. (1975), qui présente de nombreux avantages. Il s'agit d'une trousse prête à l'emploi HYPRONOSTICON (ORGANON-TEKNIKA) pour dosage colorimétrique manuel. C'est cette même technique que nous avons retenue pour le dosage en automatique sur auto-analyseur, à la suite de la mise au point de DAKKAK et DREUX (1976).

1 . MATERIEL HUMAIN .

1 . 1 . Choix des témoins (sujets normaux).

Nos témoins sont des sujets normaux ambulatoires travaillant au Laboratoire de l'hôpital Henry Gabrielle et ayant bien voulu participer à cette étude.

Il s'agit de 10 femmes de 23 à 43 ans et de 2 hommes de 25 ans.

1 . 2 . Choix des malades.

18 sujets ont été étudiés.

Il s'agit de 17 blessés médullaires et d'un traumatisé crânien, soit 12 hommes et 8 femmes de 18 à 63 ans.

Les malades sont des sujets immobilisés ou ambulants, dont les dates de verticalisation ou de mise en fauteuil roulant sont connues.

- 8 d'entre-eux présentaient une P.O.A.N. évolutive avec
 - . phosphatases alcalines élevées
 - . aspect radiologique flou
 - . syndrome clinique de tuméfaction articulaire récent.

Ils étaient tous du sexe masculin, ils ont été étudiés sur des périodes variables allant de 22 jours à 438 jours après l'apparition de l'ostéome neurogène. Les urines ont été prélevées durant trois jours consécutifs chaque semaine depuis le jour où la P.O.A.N. a été diagnostiquée. Les résultats des dosages ont fait l'objet de calculs statistiques groupés par tranches de 30 jours jusqu'à 120 jours.

Les malades sans P.O.A.N. étaient au nombre de dix, dont 4 hommes et 6 femmes paraplégiques étudiés dès leur entrée à l'hôpital dans les mêmes conditions que précédemment et sur des périodes allant de 65 jours à 304 jours. Aucun n'a présenté de P.O.A.N. au cours de son séjour à l'hôpital.

Sur tous les échantillons d'urine quelle que soit leur provenance (sujets normaux, P.O.A.N. -, P.O.A.N. +), nous avons dosé

- 1'hydroxyproline totale,
- 1'hydroxyproline libre,
- 1'hydroxyproline introduite dans des peptides de masse moléculaire élevée ou hydroxyproline non dialysable.

2 . NATURE DU REGIME ALIMENTAIRE .

La majorité des auteurs HADDAD (1970), KRANE (1970), LAURENT et HENRY (1970), CERDA et coll. (1970), DREUX (1970), LEYMARIE (1971), CALLAHAN et coll. (1972), ANASUYA (1974), préconisent un régime sans collagène strict ou seulement pauvre en collagène 24 heures avant le début des prélèvements et durant toute la durée de ceux-ci.

2 . 1 . Témoins.

Les sujets témoins ont permis d'établir nos valeurs de référence sous différents régimes alimentaires au cours de trois périodes successives pendant lesquelles ces sujets ont été soumis d'abord à une alimentation normale, puis à un régime sans collagène, enfin à un régime chargé en collagène.

o Alimentation normale (S.R.)

o Sous régime chargé en collagène (R.C.C.), les sujets ont ingéré de grandes quantités de viande (surtout des bas morceaux), de charcuterie à base de gélatine, de confiture et de desserts industriels, de bière et d'alcool.

o Pour le régime sans collagène (R.S.C.), nous avons suivi les indications de ZIFF (1956) c'est-à-dire :

- 220 à 250 g. de glucides, soit par exemple :

pain.....	200 g.
+ légumes verts.....	500 g.
+ pommes de terre.....	200 g.
ou légumes secs.....	100 g.
ou riz.....	100 g.
+ fruits.....	200 g.

- 90 g. de lipides

- 70 g. de protéines (fromage - oeuf)

- Boissons autorisées : café noir, thé (sucré à volonté)

à exclure : lait, bière, vin, eaux minérales

- Condiments autorisés : sel, poivre, épices

à exclure : fromage râpé, extrait de viande, gélatine

SOIT AU TOTAL : 2 000 calories environ, et moins de 100 mg d'hydroxyproline par jour.

Ces deux régimes ont été administrés pendant une période de cinq jours consécutifs comportant : les deux jours précédant le premier recueil des urines (pour permettre à l'organisme d'éliminer ou au contraire de se charger en hydroxyproline), et les trois jours de l'épreuve.

L'ensemble de ces dosages nous a permis d'apprécier l'importance des variations de l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline en fonction d'apports nutritionnels variés.

2 . 2 . Les sujets malades.

Les sujets paraplégiques étudiés au cours de notre étude ont suivi un régime sans collagène sous la surveillance de la diététicienne de l'hôpital, pendant les 48 heures précédant le recueil des urines et durant les trois jours des prélèvements, ceci dans le but d'avoir des résultats reproductibles et de ne mettre en évidence que les variations pathologiques.

3 . PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES URINES .

D'une façon générale, tous les auteurs recommandent le prélèvement des urines sous toluène, les échantillons étant conservés au réfrigérateur ou congelés.

Le problème du recueil des urines s'est posé pour nos sujets paraplégiques : en effet, la paralysie des sphincters entraîne une rétention vésicale des urines et ces malades n'ont pas de miction normale. Dans le premier temps, les malades ont une sonde à demeure et les poches plastique servant au recueil des urines sont mises en place stérilement, un examen bactériologique régulier permet de vérifier la stérilité des urines des malades. Plus tard, au cours de leur rééducation, les paraplégiques apprennent à se percuter pour effectuer seuls la miction des urines.

Il convenait donc pour nous de pratiquer un prélèvement urinaire identique chez les sujets sondés et ceux qui ne l'étaient pas, et tout emploi de toluène ou de papier imprégné d'antiseptique s'est avéré impossible

en raison des sondes.

Nous nous sommes contentée de recueillir les diurèses de 24 heures dans les services, les urines après homogénéisation étant réparties en plusieurs échantillons pour pouvoir doser séparément l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable.

Les échantillons étaient congelés et conservés ainsi jusqu'au dosage.

Nous avons vérifié que nos conditions de prélèvement et de conservation conduisaient à des résultats reproductibles.

4 . METHODE DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE UTILISEE .

La technique de dosage de l'hydroxyproline totale décrite par GOVERDE et VEENKAMP (1972) comporte les temps suivants :

- Fixation de l'hydroxyproline libre et liée aux peptides sur une résine échangeuse de cations et lavage de la résine par l'eau distillée pour éliminer les substances risquant d'interférer dans le dosage.
- Hydrolyse dans des tubes spéciaux gradués à bouchage efficace.
- Elution de l'hydroxyproline fixée sur la résine par la soude 2N.
- Oxydation de l'acide aminé par la chloramine T en Acide pyrrole-2-carboxylique et pyrrole.
- Détermination par colorimétrie du taux des dérivés pyrroliques formés par le para-diméthyl-amino-benzaldehyde en milieu hydro-alcoolique acide à chaud.

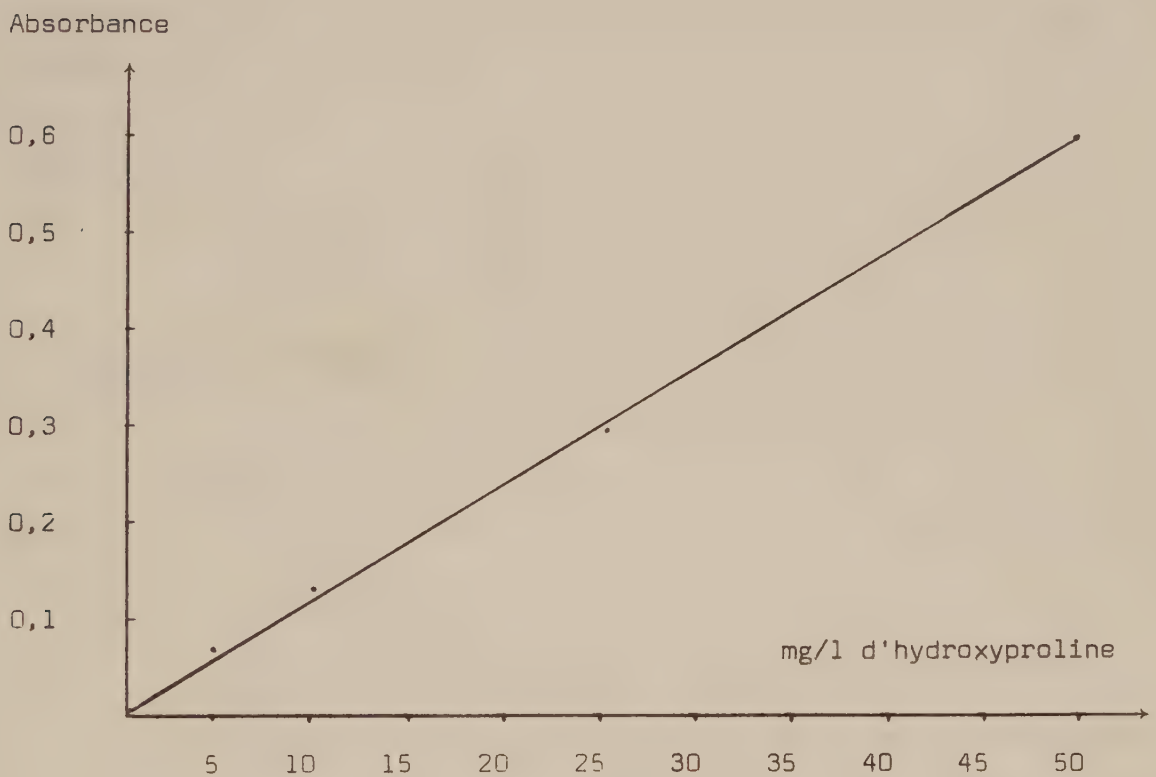
Nous avons apporté quelques simplifications au protocole opératoire en raison du nombre élevé d'échantillons à doser.

- Emploi de deux étalons pour chaque série de dosage, sans toutefois effectuer un étalon interne pour chaque urine, comme le fabricant le préconise.

- Diminution des quantités de réactif pour chaque dosage.

Des dosages effectués en parallèle avec les deux techniques (celle du fabricant et la nôtre) n'ont pas donné de résultats significativement différents.

Nous avons vérifié la linéarité de la réaction colorée dans une zone de concentration allant jusqu'à 50 mg/l d'hydroxyproline. Pour cette concentration, l'absorbance lue au spectrophotomètre Beckman modèle 24 est de 0,590.



DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE PAR LA METHODE DE GOVERDE ET VEENKAMP

Lorsqu'une urine renferme une quantité d'hydroxyproline supérieure à 50 mg/l, nous avons refait le dosage en diluant l'urine.

Compte tenu :

- de la linéarité de l'absorbance dans la zone des concentrations retenues

- de l'impossibilité d'effectuer pour chaque urine deux déterminations en pratiquant comme le conseille le fabricant, la deuxième détermination sur l'urine additionnée d'un étalon interne,

nous avons retenu l'introduction, dans chaque série de dosages, de deux échantillons identiques de la solution étalon d'hydroxyproline à 50 mg/l, dont l'absorbance moyenne nous a servi à calculer chaque fois les concentrations en hydroxyproline des urines.

Nous avons effectué sur les différentes absorbances mesurées pour les étalons introduits dans chaque série de dosages, un contrôle statistique pour mettre en évidence la reproductibilité de la méthode : les résultats obtenus confirment les qualités de la réaction colorée au para-diméthyl-amino-benzaldéhyde.

Nombre de dosages	n	=	217
Moyenne	$\bar{x}$	=	0,590
	variance	=	0,001
	écart type	=	0,033

4 . 1 . Matériel et méthode.

4 . 1 . 1 . Matériel.

- un autoclave,
- une centrifugeuse,
- un bain-marie à 60° C,
- un spectrophotomètre Beckman - modèle 24,
- des tubes de verre borosilicaté (16 x 100 mm) à double calibration 2,5 ml et 10 ml, munis d'une capsule vissée et d'un obturateur en caoutchouc (à usage unique) pour assurer une étanchéité parfaite à l'autoclavage.

4 . 1 . 2 . Réactifs.

- des comprimés de 250 mg de résine Amberlite CG 120 type II, 200 - 400 mesh, mise sous forme H⁺ et additionnée de liants et de substances de remplissage.
- une solution étalon aqueuse d'hydroxyproline à 50 mg/l en ampoules stérilisées.
Stabilité illimitée à la température ambiante.

- solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 dans l'éthanol.
- solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2 N.
- solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N.
- réactif oxydant : il est composé de
 - . chloramine T pure,
 - . solution tampon renfermant du propanol-2 à 30,8 p. 100 dans un tampon citrate (0,10 M) - acétate (0,35 M) à pH 6.

La chloramine T est dissoute dans le tampon pH 6 extemporanément, dans les conditions de concentration définies plus loin (4.1.3.3.).

La solution obtenue ne se conserve pas plus de 15 mn à la température du Laboratoire.

- réactif colorant :
 - . Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde pur pour analyse (P.D.A.B.)
 - . Acide perchlorique à 60 p. 100 (MERCK)
 - . Propanol-2 pour analyse (MERCK).

Préparation extemporanée du réactif par dissolution du P.D.A.B. dans l'acide perchlorique et l'isopropanol, dans les conditions définies plus loin (4.1.3.4.).

4 . 1 . 3 . Méthode.

4 . 1 . 3 . 1 . Hydrolyse.

On numérote une série de tubes spéciaux à double graduation de la façon suivante :

- un tube B = Blanc
- deux tubes E_1 et E_2 = témoins étalons
- les autres tubes sont numérotés comme les urines.

Un comprimé de résine est placé dans chaque tube et on opère selon le schéma suivant :

N° des tubes Réactifs	B	E ₁	E ₂	U ₁	U ₂
Etalon Hydroxyproline		1 ml	1 ml		
Urine				0,5 ml	0,5 ml
Eau distillée	10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml

On ajoute de l'eau distillée dans tous les tubes jusqu'au trait de jauge de 10 ml, pour le lavage de la résine. Les tubes sont fermés à l'aide d'obturateurs de caoutchouc à usage unique, et fortement agités. Ils sont rapidement centrifugés 10 mn à 3 000 trs/mn et le surnageant est décanté avec précaution, en une fois et en un seul mouvement, afin d'éviter toute perte de résine.

Les tubes contenant la résine humide sont alors rebouchés avec leur obturateur de caoutchouc et fermés à l'aide d'une capsule à vis résistante, spécialement conçue pour pouvoir subir de nombreux autoclavages, ce qui assure l'hydrolyse des peptides fixés sur la résine.

Ils sont ensuite autoclavés trois heures à 120° C.

4 . 1 . 3 . 2 . Neutralisation et élution.

Après refroidissement à la température du laboratoire, les tubes sont ouverts. Dans chacun d'eux est ajoutée une goutte de solution de phénolphtaléïne, puis la résine humide est neutralisée par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium 2 N goutte à goutte sous agitation constante jusqu'au virage et apparition d'une coloration rose stable.

Les tubes sont centrifugés 5 mn à 1 500 g. (3000 trs/mn).

Puis le volume de milieu réactionnel est complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge de 2,5 ml avec une très grande précision ; ils sont ensuite agités fortement sur un agitateur pour tubes (HEIDOLPH) et centrifugés pendant 5 mn à 1 500 g. (3 000 trs/mn). L'élution ainsi réalisée, le surnageant doit être parfaitement limpide.

4 . 1 . 3 . 3 . Oxydation.

Dans des tubes à essais en Pyrex étiquetés de la même manière que les tubes à hydrolyse, nous introduisons 0,25 ml du surnageant et nous ajoutons, avec une pipette Pasteur, une goutte d'acide chlorhydrique 2 N dans chaque tube, pour décolorer l'indicateur.

Le réactif oxydant est préparé extemporanément en fonction du nombre de tubes à doser conformément au tableau suivant :

Nombre total de tubes	Poids (mg) de réactif oxydant à peser (chloramine T)	ml de Tampon pH 6 à ajouter
60	330	24
100	550	40

Après addition dans chaque tube de 0,5 ml de Propanol-2 et 0,25 ml de réactif oxydant, les tubes sont vigoureusement agités sur l'agitateur et laissés au moins 4 minutes à la température du Laboratoire (jamais plus de 6 minutes).

4 . 1 . 3 . 4 . Réaction colorée.

Le réactif pour le développement de la réaction colorée est préparé selon le schéma suivant, en fonction du nombre de

tubes à analyser.

Nombre total de tubes	Poids (g) de P.D.A.B. à peser	ml d'Acide perchlorique à ajouter	compléter avec propanol-2 à ... ml
60	24	36	330
100	40	60	550

Tous les tubes sont additionnés de 5 ml de réactif colorant, agités et placés 25 minutes dans un bain-marie à 60° C puis refroidis sous eau courante pendant 5 minutes et laissés 30 minutes à la température du Laboratoire. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 560 nm en faisant le zéro sur le Blanc.

Le réactif colorant (para-diméthyl-amino-benzaldéhyde) présente une coloration jaune ; celle-ci s'amplifie lors de la réaction avec les dérivés pyrroliques provenant de l'oxydation de l'hydroxyproline.

La technique d'oxydation et de coloration peut se résumer selon le schéma suivant :

N° des tubes Réactifs	E	E ₁ 50 mg/l	E ₂ 50 mg/l	U ₁	U ₂
Surnageant en ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Acide chlorhydrique 2 N en goutte	1	1	1	1	1
Propanol-2 en ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Réactif oxydant en ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agiter et attendre au moins 4 minutes.					
Réactif colorant en ml	5	5	5	5	5
Agiter, maintenir 25 minutes au bain-marie à 60° C puis 30 minutes à la température ambiante.					

4 . 1 . 3 . 5 . Calculs.

$$\frac{A (Em) \times 50 \times 2}{A (u)} = C \quad \text{quantité d'hydroxyproline totale contenue dans l'urine exprimée en mg/l.}$$

A (Em) : Moyenne des absorbances des étalons à 50 mg/l.

50 : Coefficient tenant compte de la concentration de l'étalon en mg/l.

2 : Coefficient tenant compte de la prise d'essai de l'urine (0,5 ml).

A (u) : Absorbance lue pour l'urine.

4 . 2 . Intérêt de la méthode employée.

La technique utilisée présente un certain nombre d'avantages sur celles classiquement employées.

Elle ne nécessite pas d'hydrolyse chlorhydrique en ampoules scellées, et ne comporte pas de passage sur colonne de résine, gel filtration ou extraction par le toluène pour l'élimination des substances parasites. Cette deuxième étape est remplacée dans notre méthode par la fixation de l'hydroxyproline urinaire sur la résine Amberlite : les substances gênantes, les pigments de l'urine sont éliminés par le lavage de la résine à l'eau distillée ; nous avons pu ainsi effectuer sans difficulté le dosage de l'hydroxyproline dans certaines urines contenant du bleu de méthylène.

5 . METHODE DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE LIBRE .

5 . 1 . Description de la méthode.

Le dosage de l'hydroxyproline libre s'effectue de la même façon que celui de la totale ; seul l'autoclavage 3 heures à 120 ° C n'est pas effectué.

2 ml d'urine sont introduits dans les tubes spéciaux contenant un comprimé de résine, l'eau distillée est ajoutée jusqu'au trait de jauge de 10 ml. Les tubes sont vigoureusement agités, centrifugés 10 mn à 3 000 trs/mn, le surnageant est décanté avec précaution et la résine restant dans les tubes est traitée de la même manière que pour le dosage de l'hydroxyproline totale c'est-à-dire :

- Neutralisation et élution
- Oxydation
- Coloration.

Les réactifs sont préparés de la même façon qu'au chapitre précédent. Le schéma général de la réaction est le suivant :

N° des tubes	B	E ₁	E ₂	U ₁	U ₂
Réactifs ajoutés aux tubes					
Introduire dans des tubes spéciaux à double calibration, les réactifs dans l'ordre suivant :					
Etalon hydroxyproline à 50 mg/l en ml		1	1		
Echantillon d'urine en ml				2	2
Eau distillée qsp 10 ml (trait de jauge)	10	10	10	10	10
Agitation, centrifugation puis décantation					
Phénolphtaléine en goutte	1	1	1	1	1
Neutralisation goutte à goutte par l'hydroxyde de sodium 2 N jusqu'à coloration rose, centrifugation et ajustement au trait de calibration de 2,5 ml très exactement. Agitation et centrifugation 5 mn à 3 000 trs/mn.					
Introduire dans des tubes à essai :					
Surnageant en ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Acide chlorhydrique 2 N en goutte	1	1	1	1	1
Propanol-2 en ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Réactif oxydant en ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agiter et maintenir en contact au moins 4 minutes à température ambiante.					
Réactif colorant en ml	5	5	5	5	5
Agiter et maintenir au bain-marie à 60° C pendant 25 mn. Refroidir et mesurer l'Absorbance à 560 nm contre le Blanc, après maintien 30 minutes à la température du Laboratoire.					

Les taux d'hydroxyproline libre dans les urines étant très faibles, nous avons utilisé des prises d'essais d'urine plus importantes pour que les résultats soient reproductibles et l'absorbance mesurable sans difficulté.

5 . 2 . Calculs des résultats.

$$\frac{A (Em) \times 50}{A (u) \times 2} = C \quad \text{quantité d'Hydroxyproline libre contenue dans l'urine, exprimée en mg/l.}$$

A (Em) : Moyenne des absorbances des étalons à 50 mg/l.

50 : Coefficient tenant compte de la concentration de l'étalon en mg/l.

2 : Coefficient tenant compte de la prise d'essai de l'urine (2 ml).

A (u) : Absorbance lue pour l'urine.

6 . ISOLEMENT ET DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE .

6 . 1 . Technique de dialyse.

Nous nous sommes inspirée de la méthode décrite par ANASUYA (1974).

Elle consiste à introduire un échantillon d'urine dans un tube à dialyse Visking (tube sans soudure en cellulose régénérée ("méthode visqueuse") et à laisser dialyser à + 4° C, sans agitation, les échantillons 24 heures contre une solution de chlorure de sodium 0,15 M, puis 24 heures contre de l'eau distillée.

Le dialysat recueilli est soumis à l'hydrolyse avant développement de la réaction.

6 . 2 . Matériel.

Le matériel est identique à celui décrit aux paragraphes 4.1.1. et 4.1.2.

Il faut y ajouter :

- flacons de 500 ml
- tubes de dialyse Visking (Poly-Labo-Paul BLOCK) sans soudure en cellulose régénérée "méthode viscosc" à paroi mince.
Le diamètre moyen des pores est de 24 Å :
- .(réf. 24/32) retenant des composés de masse moléculaire égale ou supérieure à 6 000 - 8 000 (l'épaisseur moyenne de la paroi sèche est de 30 microns).
- .(réf. 25/32) retenant des composés de masse moléculaire inconnue (l'épaisseur moyenne de la paroi sèche est de 30 microns).
- .(réf. 27/32) retenant des composés de masse moléculaire égale ou supérieure à 12 000 - 14 000 (l'épaisseur moyenne de la paroi sèche est de 23 microns).
- du fil de fer fin en bobine pour fermer les tubes de dialyse et les accrocher aux flacons.

6 . 2 . 1 . Méthode.

Au début de notre étude, nous avons utilisé les tubes de dialyse (réf. 25/32), bien que le fabricant ne donnât aucune indication sur les masses moléculaires retenues ; depuis, les tubes (réf. 24/32) et (réf. 27/32) ont été calibrés par le fabricant ; nous avons donc cherché à évaluer les masses moléculaires des peptides retenus par les tubes (réf. 25/32) qui nous ont servi durant tout notre travail, afin d'interpréter les résultats.

Sur les sujets témoins, les dialyses ont été faites sur les trois types de tubes (en parallèle et en double chaque fois) puis les résultats comparés du point de vue statistique. (voir tableau p.58)

Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus sur les tubes (réf. 24/32) et (réf. 25/32), mais qu'il existe une différence significative entre les résultats obtenus sur les tubes (réf. 24/32) et (réf. 27/32) de même que sur les tubes (réf. 25/32) et (réf. 27/32).

Nous pouvons donc affirmer que les tubes de dialyse utilisés (réf. 25/32) retiennent des molécules de masse moléculaire égale ou supérieure à 6 000 - 8 000.

Les tubes de dialyse sont coupés à la longueur voulue et immergés quelques instants dans une solution de chlorure de sodium 0,15 M ; 6 ml d'urine y sont ensuite introduits et mis à dialyser à + 4° C sans agitation 24 heures contre 500 ml de chlorure de sodium 0,15 M puis à nouveau 24 heures contre la même quantité d'eau distillée.

Après les 48 heures de dialyse, les tubes sont recueillis, séchés, le volume final qu'ils contiennent est mesuré et noté. 5 ml de dialysat sont ensuite prélevés à la pipette, placés dans les tubes spéciaux pour hydrolyse contenant un comprimé de résine, et le volume complété à 10 ml par de l'eau distillée. Les tubes sont fermés à l'aide de l'obturateur de caoutchouc (à usage unique), centrifugés 10 mn à 3 000 trs/mn, le surnageant est décanté. Les tubes munis de leur obturateur en caoutchouc puis d'une capsule à vis sont autoclavés 3 heures à 120 ° C pour l'hydrolyse.

Toutes nos dialyses ont été effectuées en double pour chaque urine, et nous nous sommes servie de la moyenne des deux résultats obtenus pour les calculs statistiques.

Hydrolyse, oxydation et coloration sont conduites comme nous l'avons décrit au chapitre 4.1.3. pour le dosage de l'hydroxyproline totale, la seule différence étant constituée par la prise d'essai de dialysat qui est de 5 ml pour le dosage de l'hydroxyproline non dialysable.

6 . 2 . 2 . Calcul des résultats.

$$\frac{A (Em) \times 50 \times Q}{A (u) \times 5 \times 6} = C \quad \begin{array}{l} \text{quantité en mg/l d'hydroxyproline non} \\ \text{dialysable contenue dans l'urine analy-} \\ \text{sée.} \end{array}$$

A (Em) : Moyenne des absorbances des étalons à 50 mg/l.

A (u) : Absorbance lue pour l'urine.

- 50 : Coefficient tenant compte de la concentration de l'étalon en mg/l.
- 5 : Coefficient tenant compte de la prise d'essai de l'échantillon dialysé (5 ml).
- Q : Volume en ml de dialysat recueilli en fin de dialyse.
- 6 : Coefficient tenant compte de la prise d'essai de l'urine (6 ml).

RÉSULTATS

1 . ASPECTS ANALYTIQUES CONCERNANT LA METHODE UTILISEE .

1 . 1 . Etude de l'influence de la conservation des échantillons sur le taux d'hydroxyproline totale .

Nous avons recherché les modifications éventuelles de la teneur des urines en hydroxyproline totale au cours de la conservation.

Nous avons donc congelé, le même jour, toute une série de tubes contenant la même urine (et ceci pour plusieurs urines) et nous avons effectué des dosages d'hydroxyproline totale régulièrement au cours du temps sur ces échantillons.

1 . 1 . 1 . Résultats.

Nous avons considéré comme dosage de référence (ou comme "taux zéro") le résultat du premier dosage effectué sur l'urine, et nous avons noté les variations positives ou négatives, par rapport à ce dosage.

Nos études ont porté sur une période de 140 jours à partir de la date de prélèvement des échantillons, ce qui nous a donné le tableau (page 53).

Nous avons calculé le coefficient de corrélation linéaire :
 $r = 0,18229$ non significatif à 5 p. 100.

1 . 1 . 2 . Conclusions.

Le coefficient de corrélation linéaire étant non significatif à 5 p. 100, nous pouvons en conclure que le taux d'hydroxyproline totale ne dépend pas significativement du temps.

D'autre part, la pente de la droite ($= 0,029$) de régression de l'hydroxyproline n'est pas significativement différente de zéro : on peut donc considérer que le taux d'hydroxyproline totale ne varie pas au cours de la conservation des échantillons.

Hydroxyproline totale
(écarts)

DROIT DE RÉGRESSION DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE EN FONCTION DU TEMPS

Coefficient de corrélation linéaire $r = 0,18229$

temps (jours)

20
27
24
21
18
15
12
9
6
3
0
-3
-6
-9

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
0E1
0H1

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

1 . 2 . Etude de la répétabilité de la méthode de dosage de l'hydroxyproline libre .

Nous avons vérifié la répétabilité de notre méthode de dosage de l'hydroxyproline libre, en effectuant des dosages en aveugle sur nos échantillons, le même jour, et en comparant ainsi les résultats obtenus.

1 . 2 . 1 . Résultats.

La valeur du premier dosage sert de référence et nous étudions l'écart par rapport à cette valeur pour les autres dosages effectués en aveugle.

Sur l'ensemble des sujets, nous effectuons un test de comparaison de la moyenne de ces écarts avec la valeur de référence zéro.

Les résultats sur les écarts sont les suivants :

nombre de dosages	n	=	29
moyenne	$= \bar{x}$	=	- 0,001
variance		=	0,001
écart type		=	0,394
coefficient de variation		=	3,94 p. 100

Le test de Student nous donne un t observé = - 0,0138 non significatif (N.S.).

1 . 2 . 2 . Conclusions.

Le test de Student nous donne un t observé non significatif, nous pouvons conclure à la bonne répétabilité de nos résultats pour notre méthode de dosage de l'hydroxyproline libre.

2 . VALEURS DE REFERENCE DES DIFFERENTES FORMES D'EXCRETION URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ DES SUJETS AMBULATOIRES TEMOINS EN FONCTION DU REGIME ALIMENTAIRE .

Les résultats obtenus sont présentés en tableaux dans les pages suivantes. Les abréviations utilisées sont :

T = Hydroxyproline totale en mg/24 heures

L = Hydroxyproline libre en mg/24 heures

N D n° 1 = Hydroxyproline conjuguée non dialysable de masse moléculaire retenue à partir de 6 000 - 8 000 (réf. 24/32)

N D n° 2 = Hydroxyproline conjuguée non dialysable de masse moléculaire retenue inconnue (réf. 25/32) (et que nous avons essayé de comparer et de déterminer par rapport aux n° 1 et 3)

N D n° 3 = Hydroxyproline conjuguée non dialysable de masse moléculaire retenue à partir de 12 000 - 14 000 (réf. 27/32)

D = Hydroxyproline conjuguée dialysable en mg/24 heures

Elle est obtenue par différence

$$D = T - (L + N D n^{\circ} 2).$$

TABLEAU COMPARATIF DES TROIS DIALYSES

	ND ₁	ND ₂	ND ₃
Régime sans collagène	1,67	1,55	0,86
Sans régime	1,88	1,75	0,89
Régime chargé en collagène	1,73	1,92	0,84

Test t de Student

	t observé		
Comparaison	1 - 2	1 - 3	2 - 3
Régime sans collagène	0,36 NS	2,75 ⁺⁺	2,40 ⁺⁺
Sans régime	0,38 NS	6,54 ⁺⁺⁺	5,85 ⁺⁺⁺
Régime chargé en collagène	- 0,59 NS	3,33 ⁺⁺	3,90 ⁺⁺

2 . 1 . Régime sans collagène : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai.

EXCRETION DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ LES TEMOINS SOUS REGIME SANS COLLAGENE

N° des sujets	1er JOUR						2ème JOUR						3ème JOUR					
	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	O	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D
1	16,5	1,16	1,03	1,18	0,74	14,16	15,7	0,57	1,04	1,24	0,50	13,89	17,3	1,62	1,55	1,55	0,77	14,13
2	16,9	1,53	1,98	1,93	0,81	13,44	14	1,30	1,89	1,51	0,90	11,19	13,3	1,28	1,28	1,10	0,52	10,92
3	15,9	0,98	1,20	1,71	0,68	13,21	13,7	0,98	1,69	1,33	0,40	11,39	13,8	0,88	1,10	1,32	0,84	11,60
4	14,5	0,85	2,16	1,79	0,92	11,86	14	0,88	1,83	1,68	0,70	11,44	13,7	0,90	1,14	0,94	0,57	11,86
5	11,2	0,77	1,05	0,66	0,32	9,77	13,2	0,92	0,95	0,98	0,34	11,30	14,6	0,65	1,10	0,70	1,27	13,25
6	15,3	1,81	1,67	1,39	0,87	12,10	15,8	1,78	1,42	1,86	0,60	12,16	14,5	1,64	1,90	2,36	0,90	10,50
7	19,6	1,30	4,24	3,95	3,49	14,35	16,5	1,39	2,35	1,89	1,28	13,22	28,8	1,36	-	-	-	-
8	16,3	1,35	1,77	1,69	0,62	13,26	23,7	3,98	2,63	1,63	0,90	18,09	17,9	3,62	1,22	1,22	0,68	13,06
10	25,5	1,44	1,86	1,80	0,93	22,26	18,6	1,50	1,51	1,54	0,70	15,56	19,2	1,66	1,34	0,97	1,04	16,57
12	22,9	1,14	2,47	2,01	0,98	19,75	25,8	1,77	1,53	1,22	0,90	22,81	21,1	1,59	1,70	1,90	0,77	17,61

Les sujets 9 et 11 n'ont pas suivi le régime sans collagène.

Les résultats du n° 7 pour le 3ème JOUR (ND) ont été éliminés par les statisticiens.

(La signification des abréviations est donnée page 55).

2 . 2 . Alimentation normale : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai.

EXCRETION DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ LES TEMOINS SOUS ALIMENTATION NORMALE

N° des sujets	1er JOUR						2ème JOUR						3ème JOUR					
	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D
1	18,7	1,07	1,25	1,22	0,52	16,41	16,6	1,65	1,21	0,95	0,61	14,00	20,1	1,62	1,77	1,74	0,86	16,74
2	24,5	2,45	1,95	1,66	1,30	20,39	16,1	1,34	1,68	1,75	1,02	13,01	16	1,21	1,91	1,52	0,77	13,27
3	29,7	1,37	1,80	1,20	0,63	27,13	30,5	0,94	1,88	1,65	0,86	27,91	21	1,13	2,43	1,90	1,18	17,97
4	29,3	1,74	2,72	2,75	1,79	24,81	17,3	1,26	1,84	1,75	0,95	14,29	15,8	0,94	1,64	1,74	0,76	13,12
5	22	1,91	1,58	1,04	0,68	19,05	23,1	1,30	1,74	1,28	0,76	20,52	18	0,98	1,11	1,20	0,29	15,82
6	18,6	1,22	2,01	2,11	0,68	15,27	18,8	1,22	1,58	1,43	0,78	16,15	14,7	1,22	1,54	1,63	0,68	11,85
7	18,5	1,73	3,97	2,96	2,32	13,81	18,6	1,15	2,09	2,47	1,44	14,98	22,6	1,33	3,57	3,26	2,12	18,01
8	17,2	1,11	1,38	1,09	0,26	15	27,5	1,00	1,86	1,59	0,63	24,91	8,8	1,04	0,58	0,44	0,37	7,32
9	37,4	1,12	3,08	3,13	1,54	33,15	39,5	1,09	2,54	2,53	0,96	35,88	23,6	0,92	1,87	1,88	0,85	20,80
10	23,2	1,34	1,61	1,69	0,70	20,17	25,3	2,30	2,03	1,97	0,58	21,03	17,3	1,93	1,45	1,03	0,73	14,94
11	11,7	0,66	0,70	0,83	0,51	10,21	14,8	2,42	0,36	0,56	0,26	11,82	9,2	1,89	-	-	-	-
12	30,2	2,63	2,56	3,09	1,29	24,48	25,9	2,46	2,98	2,90	1,13	20,54	24	2,65	1,62	1,63	0,68	19,72

(La signification des abréviations est donnée page 55).

2 . 3 . Régime chargé en collagène : tableau récapitulatif des résultats des trois jours de l'essai.

EXCRETION DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ LES TEMOINS SOUS REGIME CHARGE EN COLLAGENE

N° des sujets	1er JOUR						2ème JOUR						3ème JOUR					
	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D	T	L	ND.1	ND.2	ND.3	D
1	100,4	4,12	1,49	2,41	0,81	93,87	45,8	2,42	1,61	2,28	1,17	41,10	49,8	2,79	1,64	1,92	0,90	45,09
2	130,5	-	1,46	2,51	1,13	-	75	-	1,07	0,90	0,65	-	52,8	-	2,21	2,06	0,68	-
3	55,9	2,40	1,43	2,06	0,81	51,44	58,2	1,49	2,52	1,64	1,09	55,07	30,4	1,31	1,81	1,16	0,75	27,93
4	36,6	2,10	2,22	2,58	1,14	31,92	25,2	1,35	2,39	2,41	0,98	21,44	21,6	1,66	2,10	1,95	1,18	17,99
5	29,2	1,54	1,68	1,87	0,48	25,79	39,3	2,07	1,86	1,48	0,87	35,75	39,1	2,14	2,06	1,58	0,99	35,38
6	78	3,67	2,23	2,87	0,97	71,46	64,2	3,69	1,71	2,37	1,18	58,14	41	2,70	2,25	2,34	1,10	35,96
7	60,1	2,76	1,48	2,25	0,70	55,09	33,2	1,76	0,54	0,69	0,43	30,75	49,6	2,53	2,00	1,32	0,70	45,75
8	41,1	1,80	2,46	2,63	1,05	36,67	11	4,88	1,96	1,91	0,66	4,21	28,9	2,62	1,51	1,25	0,69	25,03
9	39,7	2,40	1,73	1,73	0,98	35,75	47,7	2,59	2,56	3,11	1,21	42,00	41,1	1,81	2,48	4,12	0,93	35,17
10	43,3	3,71	1,77	1,82	1,00	37,77	40,9	3,15	1,64	1,69	0,90	36,06	28,6	1,69	1,90	2,31	0,71	24,60
11	31,8	1,37	0,47	0,58	0,12	29,85	21,6	1,02	0,32	0,36	0,32	20,22	23,1	1,63	0,30	0,17	0	21,30
12	39,7	2,46	2,19	1,95	0,61	35,29	55	2,89	2,11	3,15	1,31	48,96	62,8	3,39	1,35	1,92	1,16	57,49

(La signification des abréviations est donnée page 55).

2 . 4 . Détermination des moyennes.

Sur ces résultats, nous avons déterminé nos moyennes pour chaque constituant et dans chaque période de régime. Les résultats des mesures de l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable sont les suivants :

HYDROXYPROLINE	TOTALE mg/24 h.		LIBRE mg/24 h.		NON DIALYSABLE (n° 2) mg/24 h.	
	n	$\bar{x} \pm 2 \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$	n	$\bar{x} \pm 2 \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$	n	$\bar{x} \pm 2 \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$
Régime sans collagène R.S.C.	30	17,33 ± 1,54	30	1,42 ± 0,20	29	1,55 ± 0,22
Sans régime S.R.	36	21,28 ± 2,28	36	1,48 ± 0,10	35	1,76 ± 0,24
Régime chargé en collagène R.C.C.	36	46,45 ± 7,54	33	2,42 ± 0,28	36	1,93 ± 0,26

n = nombre de dosages

$\bar{x}$ = moyenne

$\frac{s}{\sqrt{n}}$ = écart type de la moyenne.

2 . 5 . Etude comparative de l'influence du régime alimentaire sur l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable (dialyse : réf. 25/32).

2 . 5 . 1 . Résultats.

Pour chacune des formes (totale, libre puis non dialysable) nous avons effectué une comparaison des moyennes selon le test t de Student, des trois groupes pris deux à deux.

(S.R. - R.S.C., S.R. - R.C.C., puis R.S.C. - R.C.C.)

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

	t observé		
	TOTALE	LIBRE	NON (n° 2) DIALYSABLE
Comparaison :			
Sans régime / Régime sans collagène	3,62 ⁺⁺⁺	0,21 NS	0,63 NS
Comparaison :			
Sans régime / Régime chargé en collagène	- 18,35 ⁺⁺⁺	- 2,81 ⁺⁺	- 0,91 NS
Comparaison :			
Régime sans collagène / Régime chargé en col- lagène	- 20,43 ⁺⁺⁺	- 2,85 ⁺⁺	- 2,11 ⁺

NS = différence des deux moyennes non significative

+ = différence des deux moyennes significative
(0,01 < p < 0,05)

++ = différence des deux moyennes hautement significative
(0,001 < p < 0,01)

+++ = différence des deux moyennes très hautement significative
(p < 0,001)

2 . 5 . 2 . Conclusions.

Après comparaison des résultats, nous pouvons conclure que :

- le régime alimentaire a une très grande influence sur le taux
d'hydroxyproline totale.

L'écart type croît progressivement et passe de 0,77 pour le régime sans collagène à 1,14 pour le régime normal et 3,77 pour le régime chargé en collagène.

Les valeurs extrêmes sont comprises entre :

- . 11,2 mg/24 heures et 28,8 mg/24 heures pour un régime sans collagène ;
- . 8,8 mg/24 heures et 39,5 mg/24 heures pour une alimentation normale ;
- . 11 mg/24 heures et 130,5 mg/24 heures pour un régime chargé en collagène.

La dispersion des résultats croît avec la teneur de l'alimentation en collagène ou gélatine.

- l'excrétion de l'hydroxyproline libre est moins influencée que celle de l'hydroxyproline totale par la composition du régime alimentaire. Les résultats ne présentent pas de différence significative entre une alimentation normale et une alimentation sans collagène.

Les valeurs extrêmes sont comprises entre :

- . 0,57 mg/24 heures et 1,81 mg/24 heures pour un régime sans collagène ;
- . 0,66 mg/24 heures et 2,65 mg/24 heures pour une alimentation normale ;
- . 1,02 mg/24 heures et 4,88 mg/24 heures pour un régime chargé en collagène.

L'observation des résultats montre une élévation significative, mais cependant faible pour un régime chargé en collagène, par rapport aux deux autres régimes. Celle-ci ne doit pas étonner, puisque cette forme d'hydroxyproline urinaire provient de l'hydroxyproline libre circulante, elle-même formée au cours de la digestion et absorbée comme telle au niveau de l'intestin.

La fraction non dialysable des polypeptides à hydroxyproline de masses moléculaire égale ou supérieure à 6 000 - 8 000 n'est en rien perturbée par l'apport alimentaire. L'hydroxyproline

non dialysable reste stable pendant les trois périodes de régime. Les valeurs extrêmes pour l'expérience de dialyse n° 2 (réf. 25/32) sont comprises entre :

- . 0,66 mg/24 heures et 3,95 mg/24 heures pour un régime sans collagène ;
- . 0,44 mg/24 heures et 3,26 mg/24 heures pour une alimentation normale ;
- . 0,17 mg/24 heures et 4,12 mg/24 heures pour un régime chargé en collagène.

La teneur en collagène de l'alimentation influe beaucoup plus sur l'excrétion de l'hydroxyproline totale que sur celle de l'hydroxyproline libre. Elle est sans effet sur l'élimination de l'hydroxyproline non dialysable. En fonction des résultats, on peut avancer que la teneur en collagène du régime alimentaire modifie essentiellement la quantité de peptides à hydroxyproline dialysables. Celle-ci n'est pas directement mesurée, mais appréciée par différence ; la comparaison des résultats dans les trois conditions de régime alimentaire apporte confirmation de cette notion.

VALEURS MOYENNES SUR LES 3 JOURS DE L'ESSAI DE L'HYDROXYPROLINE DIALYSABLE			
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR
Régime sans collagène	14,42	14,10	13,28
Sans régime	19,99	19,59	15,36
Régime chargé en collagène	45,88	35,79	33,79

La diminution de la moyenne de l'hydroxyproline dialysable sur les trois jours consécutifs du régime chargé en collagène se superpose à celle de l'hydroxyproline totale ; elle peut s'expliquer par une diminution de "l'appétit" des sujets testés pour le régime alimentaire riche en collagène.

VALEURS MOYENNES SUR LES 3 JOURS DE L'ESSAI DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE			
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR
Régime sans collagène	17,5	17,1	17,4
Sans régime	23,4	22,8	17,6
Régime chargé en collagène	50,5	43,1	39,1

Chez les sujets normaux, l'expression des résultats en pourcentage par rapport à l'hydroxyproline totale nous donne :

	LIBRE	NON DIALYSABLE	DIALYSABLE
Régime sans collagène	8,2 %	8,9 %	82,9 %
Sans régime	6,9 %	8,3 %	84,8 %
Régime chargé en collagène	5,2 %	4,2 %	90,6 %

Sous régime chargé en collagène, nous constatons par rapport aux deux autres régimes, une nette diminution en pourcentage de l'hydroxyproline libre et non dialysable, alors que celui de l'hydroxyproline dialysable augmente.

Le pourcentage de l'hydroxyproline libre sous le régime sans collagène ou sans régime est supérieur à celui trouvé par d'autres auteurs. Cette différence est sans doute due au régime alimentaire plus strict suivi par nos témoins, entraînant une nette diminution de l'hydroxyproline totale.

En conclusion, il est indispensable de faire suivre aux malades, 48 heures avant et pendant la durée des prélèvements d'urine destinés au dosage de l'hydroxyproline, un régime si possible strict sans collagène ou tout au moins, pauvre et équilibré en collagène et ceci, dans le but d'obtenir des résultats reproductibles et comparables.

3 . DETERMINATION DES EXCRETIONS URINAIRES MOYENNES DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE ET LIBRE CHEZ LES BLESSES MEDULLAIRES P.O.A.N. - ET P.O.A.N. + .

3 . 1 . Conditions expérimentales .

Nous avons étudié l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable dans les urines de deux groupes de sujets paraplégiques : l'un atteint de P.O.A.N. (P.O.A.N. +), l'autre sans P.O.A.N. (P.O.A.N. -).

Les dosages ont été effectués chaque semaine pendant trois jours consécutifs à partir :

- de l'apparition des ostéomes neurogènes chez les P.O.A.N. +
- de l'arrivée à l'hôpital chez les P.O.A.N. -

Nous espérons pouvoir ainsi suivre l'apparition éventuelle d'une P.O.A.N. chez des sujets blessés médullaires jeunes, donc particulièrement susceptibles de développer un ostéome neurogène. Nos prévisions se sont avérées vaines, ces sujets paraplégiques n'ont pas présenté de P.O.A.N. au cours de l'évolution de leur paralysie.

Les résultats des sujets P.O.A.N. + ont été traités par tranches de 30 jours (jusqu'à 120 jours) depuis l'apparition de l'ostéome.

Les résultats obtenus chez les sujets P.O.A.N. - sont traités en une seule population comportant la totalité des résultats acquis.

3 . 2 . Résultats .

L'ensemble des résultats obtenus chez les sujets P.O.A.N. + et P.O.A.N. - est reproduit dans les tableaux hors texte.

Les valeurs moyennes sont :

	n	Moyenne hydroxyproline totale mg/24h.	n	Moyenne hydroxyproline libre mg/24h.
P.O.A.N. -	910	76,2	654	2,79
P.O.A.N. + 0 à 30 jours	72	90,0	73	3,21
P.O.A.N. + 30 à 60 jours	67	79,9	69	3,18
P.O.A.N. + 60 à 90 jours	51	85,0	56	2,78
P.O.A.N. + 90 à 120 jours	39	85,9	36	1,89

Hydroxyproline totale et hydroxyproline libre ont été mesurées dans les urines des 18 sujets paraplégiques. Il en ressort que l'hydroxyproline totale est plus élevée chez les blessés médullaires atteints d'ostéomes que chez les sujets P.O.A.N. - ; dans les deux populations, il existe cependant une très grande dispersion des résultats. Les taux trouvés sont entre 4 et 6 fois supérieurs à ceux rencontrés chez les sujets normaux.

L'hydroxyproline libre augmente modestement au début de l'installation de la P.O.A.N. et atteint des taux 2 à 3 fois supérieurs à ceux constatés chez les témoins ambulatoires ; l'excrétion s'abaisse de façon importante au cours de l'évolution, mais demeure au 120ème jour supérieure à celle du sujet normal.

4 . ETUDE DE L'HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE CHEZ LES SUJETS PARAPLEGIQUES ATTEINTS OU NON DE P.O.A.N. .

4 . 1 . Conditions expérimentales .

Elles sont identiques à celles décrites pour le dosage de l'hydroxyproline totale et de la forme libre (cf. 3.1.).

4 . 2 . Résultats .

L'ensemble des résultats obtenus chez les sujets paraplégiques P.O.A.N. + et P.O.A.N. - est reproduit dans les tableaux hors texte.

Les valeurs moyennes d'excrétion de l'hydroxyproline non dialysable chez les sujets sont données dans le tableau suivant :

Hydroxyproline non dialysable		n	$\bar{x} \pm 2 \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$
P.O.A.N. -		408	8,57 $\pm$ 0,42
P.O.A.N. +	0 à 30 jours	58	11,06 $\pm$ 1,80
	30 à 60 jours	56	9,55 $\pm$ 1,40
	60 à 90 jours	43	9,56 $\pm$ 1,58
	90 à 120 jours	33	9,43 $\pm$ 1,14
Sujets normaux Régime sans collagène		29	1,55 $\pm$ 0,22

La comparaison de la moyenne de l'hydroxyproline non dialysable chez les sujets normaux et chez les sujets paraplégiques P.O.A.N. -, à l'aide du test de Student nous donne un $t \approx 8^{+++}$, quel que soit le régime alimentaire des sujets normaux ; la moyenne de l'hydroxypro-

line non dialysable chez nos sujets paraplégiques alités P.O.A.N. - ou + présente une différence hautement significative par rapport à celle des sujets normaux.

Chez les sujets P.O.A.N. +, l'excrétion moyenne de l'hydroxyproline non dialysable est nettement supérieure à celle des sujets P.O.A.N. -, dans la phase d'installation de l'ostéome, puis décroît dès le mois suivant et paraît alors se maintenir stable. La comparaison des moyennes effectuées à l'aide du test t de Student (par tranches de 30 jours pour les P.O.A.N. +) nous donne les résultats suivants :

Comparaisons :	t observé
P.O.A.N.- / P.O.A.N.+ de 0 à 30 jours	2,69 ⁺⁺⁺
P.O.A.N.- / P.O.A.N.+ de 30 à 60 jours	1,33 NS
P.O.A.N.- / P.O.A.N.+ de 60 à 90 jours	1,21 NS
P.O.A.N.- / P.O.A.N.+ de 90 à 120 jours	1,41 NS

4 . 3 . Conclusions .

Compte tenu du nombre des échantillons observés, nous pouvons conclure que la moyenne de l'hydroxyproline non dialysable chez les paraplégiques P.O.A.N. + (de 0 à 30 jours) est très hautement significativement supérieure à celle obtenue chez les paraplégiques P.O.A.N. -, mais ne l'est plus à partir de la fin du premier mois suivant l'apparition de la P.O.A.N. et au cours de l'évolution de celle-ci.

5 . COMPARAISON DES POURCENTAGES DES FORMES D'EXCRETION DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ LES SUJETS NORMAUX ET LES SUJETS PARAPLEGIQUES .

Les résultats qui figurent dans le tableau ci-dessous ont été établis dans les mêmes conditions de régime alimentaire (régime sans collagène).

EXPRESSION DES RESULTATS EN POURCENTAGE PAR RAPPORT A L'HYDROXYPROLINE TOTALE

		LIBRE	NON DIALYSABLE	DIALYSABLE
Sujets normaux	Régime sans collagène	8,2 %	8,9 %	82,9 %
Blessés médullaires	P.O.A.N. -	3,7 %	11,3 %	85 %
	P.O.A.N.+ 0- 30 jours	3,6 %	12,3 %	84,1 %
	P.O.A.N.+ 30- 60 jours	4 %	11,9 %	84,1 %
	P.O.A.N.+ 60- 90 jours	3,3 %	11,2 %	85,5 %
	P.O.A.N.+ 90-120 jours	2,2 %	10,9 %	86,9 %

L'expression des résultats en pourcentage par rapport à l'hydroxyproline totale chez les sujets normaux, P.O.A.N. - et P.O.A.N. + met en évidence des différences dans la répartition des formes d'excrétion chez ces sujets d'une part, chez les blessés médullaires d'autre part, mais ne permet pas de distinguer les sujets P.O.A.N. + des sujets P.O.A.N. -.

Les différences portent principalement sur les pourcentages d'hydroxyproline libre et d'hydroxyproline non dialysable au cours de l'évolution de la P.O.A.N. ; on constate une diminution du pourcentage de l'hydroxyproline non dialysable, compensée par une augmentation du même ordre du pourcentage de l'hydroxyproline dialysable.

6 . COMPARAISON DES RAPPORTS :

HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE / HYDROXYPROLINE TOTALE

HYDROXYPROLINE LIBRE / HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE

HYDROXYPROLINE DIALYSABLE / HYDROXYPROLINE NON DIALYSABLE.

Nous avons été conduite à rechercher si l'apparition d'une para-ostéo-arthropathie neurogène ne pouvait pas être décelée par des modifications biochimiques avant sa révélation clinique et si la stabilisation de l'affection et l'arrêt de prolifération de la P.O.A.N. ne pouvait être contrôlée précocément. Les résultats obtenus chez les sujets paraplégiques seront comparés à ceux établis chez les sujets normaux.

6 . 1 . Etude du rapport :

Hydroxyproline non dialysable / Hydroxyproline totale.

L'étude du rapport hydroxyproline non dialysable sur hydroxyproline totale ayant déjà été faite par KRANE, il nous a semblé intéressant de le calculer sur nos résultats, pour éventuellement constater des différences entre nos sujets normaux et paraplégiques et entre les P.O.A.N. - et P.O.A.N. +.

Les résultats sont les suivants :

ND / T = 0,09 chez les sujets de référence soumis au régime sans collagène.

ND / T = 0,08 chez les sujets de référence soumis à une alimentation normale.

ND / T = 0,05 chez les sujets de référence soumis au régime chargé en collagène.

ND / T = 0,11 chez les P.O.A.N. -

ND / T = 0,12 chez les P.O.A.N. +

Nous pouvons conclure que chez les sujets ambulatoires normaux, le rapport de l'hydroxyproline non dialysable / Hydroxyproline totale est sensible au régime alimentaire mais qu'il est toujours inférieur à 10 p. 100, alors que chez les sujets paraplégiques ce même rapport est plus élevé et peut atteindre jusqu'à 15 p. 100, sans pouvoir faire de différence entre les P.O.A.N. - et les P.O.A.N. +.

Ces résultats décevants peuvent s'expliquer par le fait que chez les

paraplégiques P.O.A.N. - il existe également une augmentation de l'hydroxyproline totale secondaire à l'ostéoporose d'immobilisation constante chez les malades de l'hôpital Henry Gabrielle.

En conséquence, le rapport hydroxyproline non dialysable / Hydroxyproline totale ne permet pas d'établir un diagnostic précoce et de suivre l'évolution d'une P.O.A.N. chez les sujets paraplégiques.

6 . 2 . Hydroxyproline libre / Hydroxyproline non dialysable.

L'étude du rapport hydroxyproline non dialysable sur hydroxyproline totale ne nous satisfaisant pas, nous avons pensé que l'étude du rapport hydroxyproline libre sur hydroxyproline non dialysable pourrait nous apporter un test fiable, l'hydroxyproline libre étant moins influencée que l'hydroxyproline totale par le régime alimentaire.

L'étude réalisé chez les sujets normaux sur les trois périodes de régime alimentaire donne les résultats suivants :

	L / ND		
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR
Régime sans collagène	0,78	1,01	1,00
Sans régime	0,91	1,13	1,02
Régime chargé en collagène	1,34	1,53	1,29

Le test t de Student nous donne :

Comparaisons :	t observé		
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR
Régime sans collagène / sans régime	0,33 NS	0,26 NS	0,03 NS
Sans régime / régime chargé en collagène	- 0,97 NS	- 0,84 NS	- 0,58 NS
Régime sans collagène / régime chargé en collagène	- 1,24 NS	- 1,06 NS	- 0,56 NS

Ces résultats nous permettent de conclure que, chez les sujets normaux ambulatoires, les modifications alimentaires n'ont aucune influence sur le rapport hydroxyproline libre / Hydroxyproline non dialysable sur les trois jours consécutifs.

Chez les sujets paraplégiques, nous obtenons :

	n	L / ND
P.O.A.N. -	466	0,32
P.O.A.N. + 0 - 30 jours	54	0,21
P.O.A.N. + 30 - 60 jours	61	0,33
P.O.A.N. + 60 - 90 jours	57	0,29
P.O.A.N. + 90 - 120 jours	31	0,20

Le test t de Student nous donne :

Comparaisons :	t observé
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 0 - 30 jours	0,60 NS
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 30 - 60 jours	0,13 NS
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 60 - 90 jours	0,21 NS
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 90 - 120 jours	1,17 NS

Nous ne constatons pas de différence significative entre les paraplégiques P.O.A.N. - et P.O.A.N. +. Cependant, nous remarquons que chez les sujets normaux, la moyenne du rapport L / ND est supérieure à celle constatée chez les paraplégiques (P.O.A.N. - et P.O.A.N. +). (cf. p. 69). Ceci s'explique par le fait que chez les sujets de référence, l'hydroxyproline non dialysable est très nettement inférieure à celle observée chez les malades atteints ou non d'ostéomes.

Nous pouvons considérer que chez les sujets ambulatoires adultes, la moyenne du rapport L / ND se situe aux alentours de 1, alors que chez des malades paraplégiques ostéoporotiques, (atteints ou non de P.O.A.N.), ce même rapport est très inférieur et voisin de 0,30.

6 . 3 . Hydroxyproline dialysable / Hydroxyproline non dialysable.

L'étude des rapports précédents ne donnant pas satisfaction aux cliniciens, nous avons cherché à étudier le rapport hydroxyproline dialysable sur hydroxyproline non dialysable.

Pour les sujets normaux, pendant les trois périodes de régime et sur les trois jours consécutifs, nous obtenons :

	D / ND			MOYENNE des 3 JOURS
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR	
Régime sans collagène	9,05	9,89	11,20	10,01
Sans régime	12,01	12,45	10,51	11,69
Régime chargé en collagène	24,03	26,03	19,84	23,32

La comparaison des moyennes par le test t de Student donne les résultats suivants :

Comparaisons :	t observé		
	1er JOUR	2ème JOUR	3ème JOUR
Régime sans collagène / sans régime	2,11 ⁺	1,77 NS	- 0,47 NS
Sans régime / régime chargé en collagène	- 6,83 ⁺⁺⁺	- 7,36 ⁺⁺⁺	- 5,52 ⁺⁺⁺
Régime sans collagène / régime chargé en collagène	- 8,33 ⁺⁺⁺	- 8,51 ⁺⁺⁺	- 4,72 ⁺⁺⁺

Nous constatons donc que le rapport Hydroxyproline dialysable / Hydroxyproline non dialysable est influencé par le régime alimentaire et croît de façon importante lorsque le régime est chargé en collagène en raison de l'augmentation de l'excrétion de l'hydroxyproline dialysable ; il présente des différences très hautement significatives. Ce rapport ne montre pas de différences significatives en comparant régime sans collagène et alimentation normale : 2,11 pour le premier jour est très proche du seuil 2,1 et peut être considéré comme N.S.. Ces résultats confirment l'influence de l'alimentation sur l'excrétion de l'hydroxyproline dialysable, alors que l'hydroxyproline non dialysable n'est pas influencée par le régime.

L'étude de ce rapport chez les paraplégiques P.O.A.N. + et P.O.A.N. - est résumée dans le tableau suivant :

Régime sans collagène	n	D / ND
P.O.A.N. -	460	10,48
P.O.A.N. + 0 à 30 jours	57	7,22
P.O.A.N. + 30 à 60 jours	63	7,50
P.O.A.N. + 60 à 90 jours	47	9,10
P.O.A.N. + 90 à 120 jours	31	8,58

La comparaison des moyennes à l'aide du test t de Student nous donne :

Comparaisons :	t observé
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 0 à 30 jours	7,30 ⁺⁺⁺
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 30 à 60 jours	6,98 ⁺⁺⁺
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 60 à 90 jours	2,80 ⁺⁺
P.O.A.N. - / P.O.A.N. + 90 à 120 jours	3,19 ⁺⁺

Nous mettons en évidence que le rapport Hydroxyproline dialysable / Hydroxyproline non dialysable est un rapport fiable, pour la mise en évidence de la synthèse osseuse.

En effet, il n'apparaît aucune différence entre les valeurs trouvées (10,01) chez les sujets de référence (régime sans collagène) et les

sujets paraplégiques P.O.A.N. - (10,48) soumis aux mêmes conditions alimentaires.

Par contre, ce rapport diminue très nettement dès l'apparition de la P.O.A.N. (7,22) et demeure abaissé pendant les 60 premiers jours de sa maturation. Il remonte ensuite légèrement sans toutefois retrouver sa valeur d'origine (60ème au 120ème jour).

Ces résultats s'expliquent par l'important accroissement de l'excrétion urinaire de polypeptides à hydroxyproline de masse moléculaire élevée (> 6 000 - 8 000) dû aux troubles de l'anabolisme osseux au début de la P.O.A.N.

Lors de l'évolution de l'ostéome, la diminution de l'hydroxyproline non dialysable excrétée par les sujets paraplégiques faisant suite à la normalisation de l'équilibre biosynthèse-résorption du collagène osseux, se traduit, à partir du 60ème jour par un rétablissement progressif du rapport D / ND vers la normale.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les protocoles de dosage des différentes formes d'hydroxyproline urinaires utilisées au cours de cette étude, nous ont donné entière satisfaction, tant au point de vue de leur praticabilité, que de la reproductibilité des résultats qu'ils nous ont permis d'obtenir.

Les comprimés de résine permettent d'isoler facilement l'hydroxyproline et d'éliminer par lavage à l'eau distillée, les substances pouvant interférer dans la réaction, de même que les pigments colorés apportés par l'urine.

Lors de la détermination de l'hydroxyproline totale : l'hydrolyse est facilitée par l'emploi de tubes spéciaux parfaitement bouchés, évitant ainsi l'utilisation d'acide chlorhydrique concentré en ampoules scellées ; les inconvénients tels que produits de dégradation colorés ou risques d'explosion sont écartés.

Cette méthode simple et rapide est applicable au dosage de l'hydroxyproline non dialysable, mais aussi de la forme libre, à condition que les urines ne contiennent pas de pigments ou de substances colorées telles que le Bleu de Méthylène ou des métabolites médicamenteux.

Les essais effectués pour l'hydroxyproline totale et libre nous ont montré que la répétabilité des résultats est satisfaisante et que la congélation permet une bonne conservation des échantillons pendant 4 ou 5 mois.

Nous avons vérifié l'influence du régime alimentaire sur le taux d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline, en comparant l'élimination de l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable chez des sujets normaux soumis successivement à trois régimes alimentaires : normal, sans collagène, et enrichi en collagène.

■ VALEURS DE REFERENCE DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE.

Les valeurs de référence de l'hydroxyproline totale chez 12 sujets

normaux adultes jeunes (de 23 à 43 ans) sont comprises entre 15,8 et 18,9 mg/24 heures sous régime privé de collagène.

Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par BURKHARDT (méthode de BERGMAN et LOXLEY modifiée) avec les mêmes réactifs.

La surface corporelle moyenne adulte est en effet de 1,73 m². L'excrétion moyenne trouvée par nous (17,33 mg/24 heures) correspond à une élimination de 10 mg/24 heures/m² de surface corporelle.

(Tableau page 79).

L'écart qui sépare nos valeurs de référence de celles des différents auteurs de même que les limites larges des intervalles de référence nettement supérieures aux nôtres, peuvent s'expliquer de différentes façons :

- nos sujets soumis au régime sans collagène ont strictement observé les conseils de régime donnés par la diététicienne de l'hôpital, ce qui peut expliquer la moyenne assez basse de l'hydroxyproline totale normale et le peu de dispersion constatée pour l'ensemble de nos résultats normaux. Les différents auteurs ne semblent pas avoir pris les mêmes précautions et tout au moins ne précisent pas les conditions exactes des régimes alimentaires suivis, ce qui permet de supposer que des précautions suffisantes n'ont pas été prises.

- par ailleurs, l'âge moyen de la population observée peut avoir une influence sur le taux de l'hydroxyproline totale excrétée : notre population est jeune et homogène et diffère de celles retenues par d'autres auteurs.

- de même, le sexe des sujets témoins peut avoir une influence non négligeable : chez les hommes, les taux sont légèrement augmentés par rapport aux femmes du même âge et notre population normale est en majorité féminine.

■ REGIME ALIMENTAIRE ET FORMES D'EXCRETION URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE.

L'influence du régime alimentaire sur le taux de l'hydroxyproline

TABLEAU I

AUTEURS	METHODE	TOTALE	LIBRE
ANASUYA 1974	Prockop et Udenfriend	29,6 ± 3,99 mg / 24 h.	
BOREL 1967	Neuman et Logan	27,2 mg / 24 h.	2 mg / 24 h.
BURKHARDT 1973	Hypronosticon (Bergman et Loxley)	* 7,9 - 44,2 mg / 24 h.	
CALLAHAN 1972	Chromatographie accélérée et T. automatique	38,71 mg / 24 h.	
CERDA 1970	T. Kivirikko	14 - 46 mg / 24 h.	
DREUX 1970	T. automatique	25 ± 16 mg / 24 h.	2 ± 1,4 mg / 24 h.
FINCK 1977	Hypronosticon (Bergman et Loxley)	17,3 ± 1,5 mg / 24 h.	1,42 ± 0,2 mg / 24 h.
HAURY 1972	Bergman - Loxley	20,75 ± 7,72 mg / 24 h.	
LAURENT 1970	Prockop et Udenfriend	36 mg / 24 h.	
PAREKH 1970	T. Parekh	18,2 mg / 24 h.	
PROCKOP 1960	T. Prockop	25 ± 5 mg / 24 h.	0,5 à 1,2 mg / 24 h.
REHPENNING 1972	T. de Stegemann modifiée	13,5 ± 5,4 mg / 24 h.	
ZIFF 1956	T. Ziff	21,8 mg / 24 h.	2 à 3 % de totale

* Ces valeurs de référence ont été calculées à partir des données de l'auteur exprimées en mg / 24 h. / m2
= 14,8 ± 10,2 mg / 24 h. / m2

totale explique sans doute les périodes successives d'engouement puis de désintéressement des cliniciens vis-à-vis de ce constituant urinaire, dont les résultats leur apparaissaient non fiables, en raison des variations journalières d'origine alimentaire, indépendantes de la pathologie.

Cette influence du régime alimentaire sur l'hydroxyproline totale est connue depuis longtemps (ZIFF - 1956, MEILMAN - 1963). Il apparaît clairement que le régime sans collagène entraîne des chiffres d'hydroxyproline totale significativement différents, non seulement de ceux du régime chargé en collagène, mais aussi de ceux du régime alimentaire courant.

Le lien entre l'alimentation et l'hydroxyprolinurie totale peut expliquer la dispersion des résultats d'un jour à l'autre chez le même sujet.

Le taux d'hydroxyproline libre ne s'élève que dans le cas d'une ingestion massive de collagène ou d'aliments riches en hydroxyproline. Cet amino-acide absorbé au cours de la digestion n'est pas utilisé dans la biosynthèse des chaînes de collagène. L'hydroxyproline constituant du collagène néoformé provient en réalité de la proline d'origine alimentaire apportée par la gélatine ou d'autres sources.

En comparant les pourcentages respectifs des différentes formes d'élimination de l'hydroxyproline libre, non dialysable et dialysable par rapport à l'hydroxyproline totale pour chaque période de régime, nous mettons en évidence, une diminution progressive du pourcentage de la forme libre allant du régime sans collagène (8,2 p. 100) au régime riche en collagène (5,2 p. 100), alors que l'hydroxyproline dialysable augmente en sens inverse (82,9 p. 100 pour le régime sans collagène à 90,6 p. 100 pour le régime chargé en collagène).

Par contre, l'hydroxyproline non dialysable ($PM \geq 6\ 000 - 8\ 000$) n'est aucunement influencée par le régime alimentaire, quel qu'il soit, puisque le taux d'excrétion en mg / 24 heures de ce constituant demeure identique pour les différentes périodes de régime ;

l'expression de ces mêmes résultats en pourcentage par rapport à l'hydroxyproline totale, fait apparaître une diminution de moitié du pourcentage de l'hydroxyproline non dialysable dans le cas d'un régime riche en collagène (4,2 p. 100) par rapport au pourcentage trouvé sous régime sans collagène (8,9 p. 100) ou sous alimentation normale (8,3 p. 100).

Ce dernier chiffre est légèrement inférieur à ceux de ZIFF (1956) et de HADDAD (1970) qui évaluent l'hydroxyproline non dialysable respectivement à 9 p. 100 et 9,85 p. 100 de l'hydroxyproline totale.

Le rapport hydroxyproline dialysable / hydroxyproline non dialysable chez les sujets normaux est très nettement augmenté pendant le régime chargé en collagène (23), alors que chez les mêmes sujets soumis au régime sans collagène il est égal à 10.

Sous régime riche en collagène, l'élévation du rapport est essentiellement due à l'accroissement de la fraction peptidique à hydroxyproline dialysable, l'hydroxyproline non dialysable n'étant pas modifiée par le régime alimentaire.

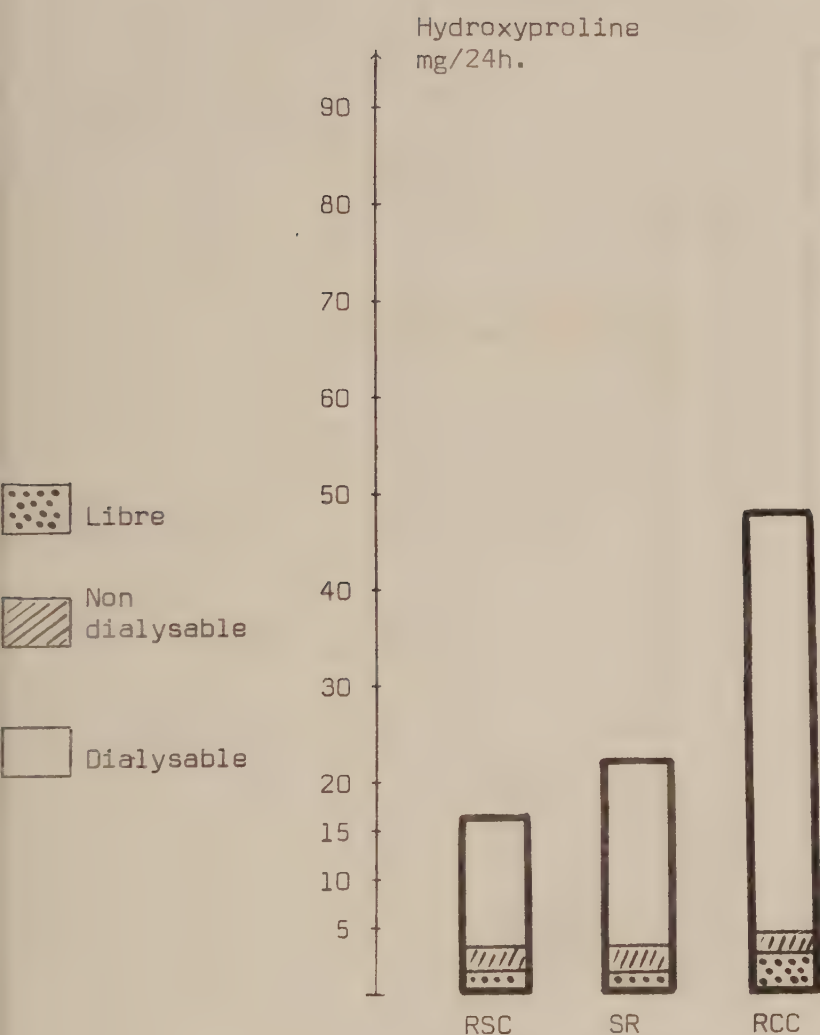
Cette modification pourrait être due à la rupture, sous l'effet de l'apport excessif de proline, de l'équilibre biosynthèse - résorption du collagène, provoquant une augmentation de la résorption osseuse.

A la suite de ces constatations, nous avons soumis les patients à un régime sans collagène pendant les 48 heures précédant le recueil des urines, dans le but d'éviter toute influence de l'alimentation sur les taux d'hydroxyproline totale et libre. Une période de 24 heures nous semblant insuffisante, dans le cas de sujets se nourrissant de viande (bas-morceaux), de charcuterie riche en gélatine, de desserts et de confitures industrielles.

Le même régime sans collagène a été appliqué aux sujets paraplégiques qui se sont montrés très coopératifs tout au long de cette étude, et ont accepté de suivre le régime strict sans collagène en dépit de nombreuses sollicitations extérieures apportées par les visiteurs.

Diagramme n° 1

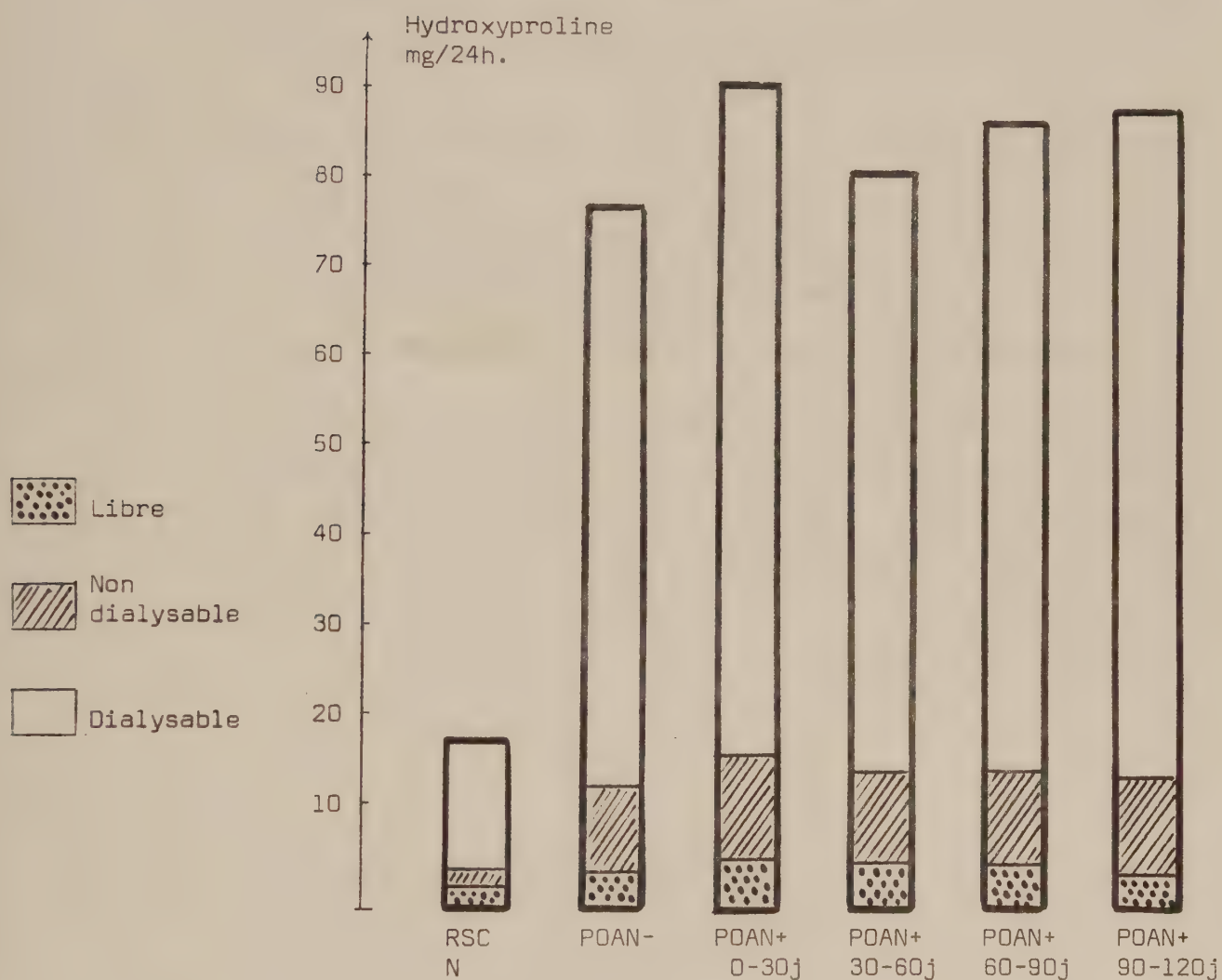
REPARTITION EN VALEUR ABSOLUE DES FORMES D'EXCRETION
DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE (mg/24 heures)
EN FONCTION DU REGIME ALIMENTAIRE CHEZ LES SUJETS NORMAUX



NB : L'hydroxyproline dialysable est obtenue par différence entre l'hydroxyproline totale et l'hydroxyproline (libre + non dialysable).

Diagramme n° 2

REPARTITION EN VALEUR ABSOLUE DES FORMES D'EXCRETION
DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE (mg/24 heures)
CHEZ LES SUJETS NORMAUX, P.O.A.N.- ET P.O.A.N.+
SOUS REGIME SANS COLLAGENE



NB : L'hydroxyproline dialysable est obtenue par différence entre l'hydroxyproline totale et l'hydroxyproline (libre + non dialysable).

■ SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS CHEZ LES SUJETS NORMAUX.

Le diagramme n° 1 représente la répartition des différentes formes d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline exprimée en mg/24 heures, et rend compte de l'ensemble des résultats obtenus chez les sujets normaux.

L'augmentation importante de l'hydroxyproline totale sous régime riche en collagène est essentiellement due à la modification de l'excrétion de l'hydroxyproline dialysable constituée de peptides de masse moléculaire inférieure à 6 000 - 8 000.

Selon DREUX (1976) cette fraction est constituée en particulier

- d'un dipeptide : Proline - Hydroxyproline
- des tripeptides : Glycine - Proline - Hydroxyproline et Acide Glutamique - Proline - Hydroxyproline

et de peptides divers composés de moins de dix amino-acides.

Le taux de ces peptides de masse moléculaire inférieure à 6 000 - 8 000 serait en rapport avec le catabolisme osseux par dégradation du collagène insoluble et influencé par le contenu en collagène du régime alimentaire. Ce fait est mis en évidence, même pour une alimentation normale, puisqu'un régime strict sans collagène provoque une très nette diminution des taux d'hydroxyproline totale sans que l'hydroxyproline libre et l'hydroxyproline non dialysable soient modifiées de façon significative.

■ SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS CHEZ LES SUJETS PARAPLEGIQUES.

Le diagramme n° 2 montre l'augmentation considérable de l'hydroxyprolinurie totale chez les blessés médullaires en général, par rapport aux adultes normaux, soumis aux mêmes conditions de régime. Cette constatation confirme les données de la littérature, chez les sujets atteints d'ostéoporose aiguë d'immobilisation. Nous remarquons aussi une légère élévation de l'hydroxyproline libre chez les

sujets paraplégiques, en regard des sujets normaux.

Mais les résultats les plus intéressants de cette étude portent sur la fraction peptidique à hydroxyproline non dialysable. Cette forme est nettement plus élevée chez les blessés médullaires soumis au régime sans collagène que chez les sujets normaux suivant le même régime. De plus, cette élévation est significativement plus importante chez les sujets paraplégiques au cours de la phase d'installation de l'ostéome et au début de son évolution (0 à 30 jours). Nous devons constater cependant que c'est la fraction peptidique à hydroxyproline dialysable ($PM < 6\ 000 - 8\ 000$) qui augmente le plus chez les blessés médullaires atteints ou non de P.O.A.N., confirmant l'accroissement de la résorption osseuse chez ces sujets.

L'expression des résultats en pourcentage par rapport à l'hydroxyproline totale nous montre une nette diminution de l'hydroxyproline libre chez les sujets paraplégiques ($\approx 3,5$ p. 100) par rapport aux sujets normaux (8,2 p. 100). A l'inverse, les fractions dialysable et non dialysable sont augmentées chez les blessés médullaires, le constituant peptidique à hydroxyproline non dialysable ne présentant qu'une différence minime entre les sujets porteurs de P.O.A.N. (≈ 12 p. 100) et les blessés médullaires P.O.A.N. - (11,3 p. 100). Le pourcentage diminue chez les sujets P.O.A.N. + au delà de 90 jours (10,9 p. 100).

Devant l'impossibilité de surveiller, chez les malades paraplégiques, l'apparition et la maturation des ostéomes neurogènes par les seuls dosages, nous avons étudié les rapports :

hydroxyproline non dialysable / hydroxyproline totale
hydroxyproline libre / hydroxyproline non dialysable
hydroxyproline dialysable / hydroxyproline non dialysable,

et cherché s'ils ne pouvaient pas apporter une information intéressante.

Le rapport hydroxyproline non dialysable / hydroxyproline totale (ND / T) apparaît significativement augmenté chez les blessés médul-

laïres, sans que l'on puisse distinguer les sujets porteurs d'ostéomes. A l'élévation du constituant non dialysable dû à la P.O.A.N. se superpose en effet une élévation proportionnelle de l'hydroxyproline totale due à l'augmentation parallèle de l'hydroxyproline dialysable ; il est toutefois surprenant que ce rapport ne permette pas de distinguer sujets P.O.A.N. - et + puisque le rapport D / ND est lui, significativement différent et que l'hydroxyproline dialysable représente 85 p. 100 environ de l'hydroxyproline totale. L'accroissement de synthèse osseuse provoqué par le développement de l'ostéome neurogène entraîne une nette augmentation de l'hydroxyproline non dialysable par rapport aux paraplégiques P.O.A.N. - ; mais cette augmentation est insuffisante pour rendre significative la variation du rapport ND / T de ces deux groupes de malades.

Le rapport hydroxyproline libre / hydroxyproline non dialysable nous est apparu comme indépendant du régime alimentaire chez les sujets normaux. Ce rapport, légèrement supérieur à 1 chez ces derniers, s'abaisse chez les blessés médullaires sans qu'il soit possible de faire une différence entre les P.O.A.N. - et les P.O.A.N. +. Ceci peut s'expliquer par le fait que les blessés médullaires atteints ou non de P.O.A.N. sont ostéoporotiques, et que chez eux, la biosynthèse du collagène est également accrue, provoquant l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline non dialysable.

A l'inverse, le rapport hydroxyproline dialysable / hydroxyproline non dialysable est fiable, et apparaît comme pouvant servir de test pour mettre en évidence l'apparition et suivre la maturation des P.O.A.N. au moins pendant les 120 premiers jours de la maladie. L'étude de ce paramètre mérite d'être poursuivie pendant un temps encore plus long jusqu'au retour à la normale.

La nette diminution de ce rapport (7,22), observée chez les sujets P.O.A.N. + durant les 30 premiers jours de l'évolution de l'ostéome, paraît provoquée par l'accroissement de l'hydroxyproline non dialysable supérieur en pourcentage (23,1 p. 100) à celui de l'hydroxyproline dialysable (14,3 p. 100). Ce rapport se maintient à 17,5 pendant le 2ème mois d'évolution de l'ostéome neurogène puis se relève au delà sans rejoindre à la fin du 4ème mois la valeur de 10,48

trouvée chez les sujets paraplégiques P.O.A.N. - ; elle correspondrait à l'augmentation de la synthèse osseuse chez ces sujets. La différence entre paraplégiques P.O.A.N. - et P.O.A.N. + est très significative (au cours des deux premiers mois d'évolution de l'ostéome neurogène).

KRANE (1970) conclut à la suite d'études in vivo sur l'incorporation de traceurs radioactifs (Proline et Hydroxyproline ^{14}C) dans le tissu protéique osseux, que les peptides urinaires, de haut poids moléculaire contenant de l'hydroxyproline sont en relation avec la synthèse du collagène.

L'étude de l'excrétion de l'hydroxyproline avant et après parathyroïdectomie chez des sujets hyperparathyroïdiens (HARRIS - 1968) a montré l'élévation du rapport hydroxyproline non dialysable sur hydroxyproline totale après l'intervention, la suppression de la stimulation exagérée à la PTH réduisant l'ostéolyse et favorisant une reprise de la synthèse osseuse. HADDAD (1970) note une diminution très importante de l'excrétion de l'hydroxyproline totale chez un patient atteint de maladie de Paget, pendant un traitement à la thyrocalcitonine, qui favorise la fixation de calcium sur l'os et l'ostéo-formation. Dans ce cas cependant, la chute de l'hydroxyproline totale s'accompagne d'une diminution proportionnelle des peptides dialysables et non dialysables de l'urine.

Les taux élevés de la fraction urinaire non dialysable des sujets porteurs de P.O.A.N. paraissent confirmer la relation entre cette fraction et la synthèse du collagène au sein de l'os néoformé.

Il s'agirait de peptides non utilisés ou transitoirement utilisés lors de la biosynthèse osseuse, ou de fragments provenant du remodelage du collagène récent.

L'élévation de la fraction non dialysable chez les blessés médullaires indemnes de P.O.A.N. bien que moindre, traduit néanmoins chez ces sujets l'existence d'une synthèse du collagène, suggérée par l'augmentation de l'hydroxyprolinurie totale, déjà constatée chez les sujets atteints d'ostéoporose (MINAIRE - 1974).

Celle-ci pourrait correspondre, soit à une tentative de réparation de l'ostéoporose aiguë engendrée par l'immobilisation (MINAIRE - 1974) soit à l'accroissement de la solubilité du collagène immature

non minéralisé du fait de la paralysie. Si cela était le cas, la réparation apparaîtrait plus nettement sur le plan biologique qu'elle n'est évidente à l'étude histologique osseuse quantitative.

La contribution du collagène extra-osseux à cette fraction non dialysable, comme d'ailleurs à l'hydroxyprolinurie totale reste inconnue. En dépit de ces incertitudes, la fraction polypeptidique non dialysable pourrait permettre d'évaluer les contributions respectives de la formation et de la dégradation du collagène osseux chez le blessé médullaire et tout particulièrement le degré de maturation des ostéomes. Mais l'élévation de cette fraction en cas de P.O.A.N. n'a été retrouvée significativement différente des P.O.A.N. - au cours de cette étude que lors des 30 premiers jours de l'évolution. Or nous savons que la maturation d'un ostéome neurogène se fait sur une période de plusieurs mois, souvent de plus d'un an. Il serait nécessaire de poursuivre cette étude chez ces sujets pendant un temps encore plus long, jusqu'au retour à la normale des résultats.

La mise au point du fractionnement des peptides de chaque fraction, de leur isolement et de leur identification permettra dans l'avenir de rechercher le ou les composés dont les variations seraient significatives du seul anabolisme du collagène osseux.

CONCLUSIONS

Nous avons établi pour notre méthodologie les valeurs de référence des différentes formes d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline totale, libre et non dialysable, chez 12 sujets normaux (10 femmes et 2 hommes) âgés de 23 à 43 ans et étudié l'influence de divers régimes alimentaires sur cette élimination.

Nous avons recherché les variations de ces paramètres chez 18 malades paraplégiques âgés de 18 à 63 ans (12 hommes et 6 femmes) dont 8 présentaient une para-ostéo-arthropathie-neurogène.

Nous avons confirmé que chez les sujets normaux, les hydroxyprolines totale et dialysable étaient très sensibles au régime alimentaire, alors que l'hydroxyproline libre n'était augmentée qu'en cas de régime riche en collagène ($0,001 < p < 0,01$) ; par contre, l'hydroxyproline non dialysable, correspondant à des peptides de masse moléculaire supérieure ou égale à 6 000 - 8 000 n'était pas influencée par le régime alimentaire, quelle que soit sa teneur en collagène.

Chez les sujets paraplégiques, nous avons confirmé une augmentation de l'hydroxyproline totale urinaire, et mis en évidence l'augmentation de la fraction polypeptidique non dialysable, que les sujets soient ou non atteints de P.O.A.N., avec cependant, une différence significative de l'hydroxyproline non dialysable, entre les sujets P.O.A.N. - et P.O.A.N. + dans la période d'installation (30 premiers jours au moins) de la P.O.A.N.

Sujet P.O.A.N. - :

Hydroxyproline non dialysable = $8,57 \pm 0,42$ mg/24 heures

Sujet P.O.A.N. + :

Hydroxyproline non dialysable = $11,06 \pm 1,80$ mg/24 heures.

Nous avons enfin mis en évidence l'intérêt de la mesure du rapport hydroxyproline dialysable / hydroxyproline non dialysable comme témoin de l'apparition d'une P.O.A.N., mais également pour le diagnostic de celle-ci, et surtout pour l'appréciation de l'évolution de sa maturation.

Le Président de la Thèse :

A. REVOL

VU, le Directeur de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques,

Ch. A. BIZOLLON

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LYON, le 11 mai 1977

Le Président de l'Université
Claude.Bernard,

D. GERMAIN

B I B L I O G R A P H I E

ALBRIGHT F., BURNETT C.H., GOPE O., PARSONS W.

Acute atrophy of bone (ostéoporosis) simulating hyperparathyroidism.
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1941, 1, 711-715

ALEX R.

Les Para-ostéo-arthropathies neurogènes.

Thèse Med. Lyon 1959 - 129 pages

AMBERT J.P., PECHERY C., CHARPENTIER C., HARTMANN L.

Acides aminés urinaires chez le sujet normal.

Ann. Biol. Clin. 1966, 24, 19-35

ANASUYA A., NARASINGA RAO B.S.

Hydroxyproline peptides of urine in fluorosis.

Clin. Chim. Acta. 1974, 56, 121-123

ANDRY N.

L'orthopédie

Lambert et Durant, Ed. Paris 1741

BARBIER F., LAVOUE G., PADIEU P.

Bilan et perspectives de la chromatographie gazeuse des acides aminés.

Les Amino-acidopathies T I

Journées Internat Pharmacie pages 157-175

Grenoble 1972

BERG R.A., KISHIDA Y., KOBAYASHI Y., INOUE K., TONELLI A.E.,

SAKAKIBARA S., PROCKOP D.J.

A model for the triple-helical structure of (Pro-Hyp-Gly)₁₀ involving
a cis peptide bond and interchain hydrogen-bonding to the hydroxyl group
of hydroxyproline.

Biochim. Biophys. Acta. 1973, 328, 553-559

BERGMAN I., LOXLEY R.

Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline.

Anal. Chem. 1963, 35, 1961-1965

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G.

An Automated procedure for quantitative determination of hydroxyproline.
Clin. Biochem. 1974, 7, 251-257

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G.

An Assay for Hydroxyproline and Proline on one Sample and a Simplified Method for Hydroxyproline.

Anal. Biochem. 1975, 63, 331-340

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G.

Simple procedures for determination of ¹⁴ C. Hydroxyproline.

Anal. Biochem. 1975, 66, 330-339

BOREL J.P., CARANJOT J.M., JAYLE M.F.

Un mode de fractionnement des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline.

Clin. Chim. Acta. 1967, 16, 409-416

BURKHARDT H., BURKHARDT F., ROMMEL K.

Die Messung des Kollagenstoffwechsels mit dem Hypronosticon-Test.

Dtshe. Med. Wschr. 1973, 98, 1847-1852

BURKHARDT H., BURKHARDT F., WEPLER R., ROMMEL K.

Automatische und Manuelle Hydroxyprolinbestimmung im Urin. Vergleich von drei Methoden.

Z. Klin. Chem. Biochem. 1974, 12, 108-115

CALLAHAN P.X., SHEPARD J.A., ELLIS S.

Accelerated Chromatographic Method for Determination of Hydroxyproline.

Anal. Biochem. 1972, 49, 155-163

CERDA J.J., TOSKES P.P., SHOPA N.A., WILKINSON J.H.

The relationship of the serum alkaline phosphatase to urinary hydroxyproline excretion in liver and bone diseases.

Clin. Chim. Acta. 1970, 27, 437-443

CHANTRAINE A.

Clinical investigation of bone metabolism in spinal cord lesions.
Paraplegia, 1971, 8, 253-259

CLEARY J., SAUNDERS R.A.

A simplified procedure for the measurement of total hydroxyproline in urine.

Clin. Chim. Acta. 1974, 57, 217-223

DABEV D., STRUCK H.

Microliter Determination of Free Hydroxyproline in Blood Serum.
Biochem. Med. 1971, 5, 17-21

DAKKAK R., DREUX C.

Automatisation du dosage de l'hydroxyprolinurie après isolement et hydrolyse des hypropeptides sur résine échangeuse d'ions.

Ann. Biol. Clin. 1976, 34, 197-202

DEJERINE Mme, CEILLIER A.

Trois cas d'ostéomes, ossifications périostées juxta-musculaires et inter-fasciculaires chez des paraplégiques par lésion traumatique de la moëlle épinière.

Rev. Neurol. 1918, 1, 159-172

DELFOSSÉ L., ORLOFF S., RAO V.H., STROSBURG E., VERBRUGGEN L.

Automated analysis of hydroxyproline in urine.

Indian J. Biochem. Biophys. 1975, 12, 280

DREUX C., LEYMARIE J.

Dosage automatique de l'hydroxyproline urinaire.

Ann. Biol. Clin. 1968, 26, 641-650

DREUX C.

L'hydroxyproline : Etude métabolique et analytique ;

Intérêt en Biologie Clinique.

Problèmes Actuels de Biochimie Appliquée, 3ème série, pages 43-95,
Masson Ed. 1970

DREUX C.

Maladies de l'os et hydroxyproline urinaire.

G.M. de France, 1970, 77, 3721-3728

DREUX C., FIET J., DAKKAK R.

L'hydroxyproline libre et peptidique issue des collagènes.

Méthodes de séparation et de dosage : applications en biologie clinique.

Ann. Dermatol. Syphilig. 1971, 98, 529-532

DREUX C., JULIEN R., DAKKAK R.

Intérêt du dosage de l'hydroxyprolinurie dans les maladies de l'os et du collagène.

Les Amino-acidopathies T II

Journées Internat Pharmacie pages 223-231

Grenoble 1972

DUBOVSKY J., MEYER R.D.

Determination of hydroxyproline polypeptides in urine and blood serum by gel filtration.

Clin. Chim. Acta, 1975, 62, 277-286

FILLIAT M., COTTE J., BRUNET J.M.

Méthode de dosage de l'hydroxyproline urinaire.

Pathol. Biol. 1966, 14, 762-767

FIRSCHEIN H.E., SHILL J.P.

The determination of total hydroxyproline in urine and bone extracts.

Anal. Biochem. 1966, 14, 296-304

FOURMAN P., ROYER P.

Calcium et tissu osseux.

Flammarion Ed. Paris, 1970 pages 171-172

GEISER M., TRUETA J.

Muscle action, bone rarefaction and bone formation.

J. Bone Jt. Surg. 1958, 40-B, 282-311

GIBBS B.F., ITIABA K., CRAWHALL J.C.

Gas chromatographic estimation of hydroxyproline.

Clin. Chim. Acta, 1974, 54, 395-398

GOVERDE B.C., VEENKAMP F.J.N.

Routine assay of total urinary hydroxyproline based on resin-catalysed hydrolysis.

Clin. Chim. Acta, 1972, 41, 29-40

GOVERDE B.C.

Un nouveau dosage spécifique de l'hydroxyproline urinaire reposant sur une hydrolyse catalysée par résine.

Document des Laboratoires de Recherche et de Développement Biochimiques, N.V. ORGANON, OSS (Pays-Bas)

GRANT R.A.

Estimation of hydroxyproline by the auto-analyser.

J. Clin. Pathol. 1964, 17, 685-687

GUILLAUMAT M., MAURY M., DEBAUD B., MASSE P.

A propos des para-ostéo-arthropathies dans les paraplégies.

Rev. Chir. Orthop., 1976, 62, 449-462

HADDAD J.G., COURANZ S., AVIOLI L.V.

Nondialysable Urinary Hydroxyproline as an Index of Bone Collagen Formation.

J. Clin. Endocrinol. Metabol., 1970, 30, 282-287

HARRIS E.D., KRANE S.M.

Urinary polypeptides related to collagen synthesis.

Clin. Res. 1968, 16, 551 (Abstr.)

HAURY H.

Zur routinemässigen Bestimmung von Hydroxyprolin in Harm.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1972, 10, 25-28

HIOCO D.

Etude critique d'une nouvelle technique du dosage d'hydroxyproline urinaire.

Document des Laboratoires de Recherche et de Développement Biochimiques, N.V. ORGANON, OSS, (Pays-Bas)

JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M., ROCHE J., WURMSER R.

Traité de Biochimie Générale.

T.I : Composition chimique des organismes (premier fascicule) page 544
Masson Ed. Paris 1959

JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M., ROCHE J., WURMSER R.

Traité de Biochimie Générale.

T.III : Les processus biochimiques de synthèse et de dégradation (troisième fascicule) pages 127-133

Masson Ed. Paris 1972

JONES J.D., SKALET A.C., BURNETT P.C.

Automated Determination of Total Hydroxyproline in urine : Use of Internal Standard.

Anal. Biochem., 1970, 37, 194-196

KIVIRIKKO K.I., LAITINEN O., PROCKOP D.J.

Modifications of a Specific assay for Hydroxyproline in Urine.

Anal. Biochem. 1967, 19, 249-255

KLEIN L., KANEFIELD D.G., HEIPLE K.G.

Effect of disuse osteoporosis on bone composition : the fate of bone matrix.

Calc.Tis. Res. 1968, 2, 20-29

KLEIN L.

Hydroxyproline in Urine and Tissues.

Stand. Methods clin. Chem. 1970, 6, 41-56

KOSFKY P.B., UDENFRIEND S.

Conversion of Proline to Collagen Hydroxyproline in a Cell-free System from chick-Embryo.

J. Biol. Chem. 1963, 238, 3966-3997

KRAFFCZYK F., HELGER R., LANG H.

Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography on Two-Layer Plates of Amino-Acids.

Clin. Chem. 1970, 16, 662-666

KRANE S.M., MUNOZ A.J., HARRIS E.D.

Urinary polypeptides related to collagen synthesis.

J. Clin. Invest. 1970, 49, 716-729

LAURENT R., HENRY J.C.

Signification et valeur diagnostique de l'élimination urinaire de l'hydroxyproline.

J. Med. Besançon, 1970, 6, 117-141

LEJEUNE E., MEUNIER P., RUITTON P.

L'hydroxyprolinurie confrontée aux données histologiques osseuses quantitatives.

Rev. Rhum. Mal. Osteoartic., 1972, 2, 107-113

LEYMARIE J.

L'hydroxyproline urinaire en biologie clinique.

Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris V, 1971, 93 pages

LICHTWITZ R., PARLIER R.

Calcium et maladies métaboliques de l'os.

T.II : Os et métabolisme du calcium à l'état pathologique . pages 225-245

L'Exp. Ed. Paris 1964

LOUISOT P.

Biosynthèse du Collagène.

C.M.L. 1975, 51, 205-208

MANNING J.M., MEISTER A.

Conversion of Proline to Collagen Hydroxyproline.

Biochemistry, 1966, 5, 1154-1165

MEE J.M.L.

Specific assay of Hydroxyproline by gaz chromatography.

J. Chromatogr. 1973, 87, 155-161

MEILMAN E.M., URIVETZKY M.M., RAPOPORT C.M.

Urinary Hydroxyproline peptides.

J. Clin. Invest. 1963, 42, 40-50

MINAIRE P.

L'ostéoporose d'immobilisation : données biologiques et histologiques quantitatives.

Thèse Med. UER Lyon-Nord, 1973, 122 pages

MINAIRE P., MEUNIER P., EDOUARD C., BERNARD J., COURPRON P., BOURRET J.

Quantitative histological data on disuse osteoporosis.

Calc. Tis. Res. 1974, 17, 57-73

MOORE S., STEIN W.H.

Chromatography of Amino-Acids on Sulfonated Polystyrène Resins.

J. Biol. Chem. 1951, 192, 663-681

MOSS C.W., LAMBERT M.A.

Analysis of hydroxyproline and hydroxylysine by gaz chromatography.

Anal. Biochem. U.S.A. 1974, 59, 259-262

NEUMAN R.E., LOGAN M.A.

The Determination of Hydroxyproline.

J. Biol. Chem. 1950, 184, 299-306

NOBBS B.T., WALKER A.W., DAVIES T.J.

A simplified method for the estimation of urinary total hydroxyproline.

Clin. Chim. Acta, 1975, 64, 219-221

PAREKH A.C., JUNG D.H.

An Improved Method for Determination of Total Hydroxyproline in Urine.
Biochem. Med. 1970, 4, 446-456

PATAKI G.

Thin-Layer Chromatography of Amino-Acids.
Chromatogr. Rev. 1967, 9, 23-26

PELKONEN R., KIVIRIKKO K.I.

Hydroxyprolinemia. An Apparently Harmless Familial Metabolic Disorder.
New. Engl. J. Med. 1970, 283, 451-456

PENNOCK C.A., MOORE G.R., HOYLE M.D.

Estimation of Hydroxyproline in Urine.
J. Med. Lab. Technol. 1970, 27, 302-307

PROCKOP D.J., UDENFRIEND S.

A specific Method for the Analysis of Hydroxyproline in Tissues and Urine.
Anal. Biochem. 1960, 1, 228-239

RAMAMURTHY N.S., ZEBROWSKI E.J., GOLUB L.M.

A Modified Procedure for Determining Hydroxyproline in Normal and Diabetic Urine.
Biochem. Med. 1971, 5, 555-558

REHPENNING W., DABELS J.

Zur Bestimmung von Hydroxyprolin im Harn.
Z. Med. Labortech. 1972, 13, 183-186

ROJKIND M., GONZALEZ E.

An Improved Method for Determining Specific Radioactivities of Proline ¹⁴C and Hydroxyproline ¹⁴C in Collagen and Noncollagenous Proteins.
Anal. Biochem. 1974, 57, 1-7

SEYMOUR G.C., JACKSON M.J.

Specific automated method for measurement of urinary hydroxyproline.
Clin. Chem. 1974, 20, 544-546

SPINELLA C.J.

Two-Dimensional Paper Chromatographic Determination of Amino-Acids in Urine.

Clin. Chem. 1969, 15, 1011-1016

STEGEMANN H.

Mikobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin - T und p - Dimethylaminobenzaldehyd.

Z. Physiol. Chem. 1958, 311, 41-45

SWITZER B.R., SUMMER G.K.

Improved Method for Hydroxyproline Analysis in Tissue Hydrolyzates.

Anal. Biochem. 1971, 39, 487-491

TEPPER T., DE VOS L.

An automated determination of free plasma hydroxyproline.

Clin. Chim. Acta, 1975, 59, 373-375

UDENFRIEND S.

Formation of Hydroxyproline in collagen.

Science, 1966, 152, 1335-1340

WALSER A., SCHOENENBERGER G.A.

Practical Evaluation of a New Method for the Routine Determination of Urinary Hydroxyproline.

Arzneimittel Fors. 1974, 24, 841-843

WOESSNER J.F.

The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino-Acid.

Arch. Biochem. Biophys. 1961, 93, 440-447

ZIFF M., KIBRICK A., DRESNER E., GRIBETZ H.J.

Excretion of Hydroxyproline in patients with Rheumatic and non-Rheumatic diseases.

J. Clin. Invest. 1956, 35, 579-587

TABLEAUX HORS TEXTE

GROUPE : P.O.A.N. -

F...

Sexe masculin

né le 10.10.1945

Etudié sur 304 jours

T...

Sexe féminin

née le 19. 6.1955

Etudié sur 108 jours

V...

Sexe féminin

née le 15. 5.1934

Etudié sur 268 jours

M...

Sexe masculin

né le 9.12.1955

Etudié sur 267 jours

N...

Sexe masculin

né le 14. 8.1913

Etudié sur 290 jours

B...

Sexe féminin

née le 30. 7.1961

Etudié sur 193 jours

V...

Sexe féminin

née le 1. 8.1934

Etudié sur 81 jours

G...

Sexe féminin

née le 11. 8.1936

Etudié sur 147 jours

P...

Sexe féminin

née le 29. 9.1949

Etudié sur 65 jours

F...

Sexe masculin

né le 13. 5.1957

Etudié sur 108 jours

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	224,9		7,8	
1	269,1		11	
2	56,6		2,19	
7	127		8,40	
8	121		3,6	
9	81,1			
14	182,3		6,09	
15	132,8		2,76	
16	223		7,88	
21	178,4		6,50	
23	154,8		5,85	
28	75,7		1,58	
29	339,4		14,56	
35	158,4		5,23	
37	72,2		1,91	
42	53,9		2,52	
44	70,2		1,95	
49	165,2		5,25	
50	154,1		4,25	
51	84,8		2,60	
56	130,1		4,37	
57	236,9		5,77	
58	162		5,18	
63	127,3		4,94	
64	115,5		5,32	
65	142,4		7,59	
86	104,9		2,6	
91	93,9	6,33	1,12	86,45
93	115	15,94	1,97	97,09
98	83,7	13,26	1,56	88,86
99	110,6	15,34	2,18	93,08
100	94,6	7,99	1,47	85,14
105	97,3		1,27	
106	138,3		2,03	
107	78,7		1	
112	132,8			
113	114,3	14,15		
114	107,1	8,54		
119	93,2	8,38		
120	145,7			
121	108,7	5,76		
126	196,5	4,85	1,67	189,98
127	125,6	7,41	1,57	116,62
128	113,2	7,81	1,98	103,41
133	64,6	10,34	1,48	52,78
134	150,3	18,67	2,57	129,06
135	74,5	7,65	1,69	65,16
140	95,9	7,70	1,92	86,28
141	89,1	2,35	1,16	85,59
142	62,8	6,53	1,53	54,74
147	101	11,44	1,41	88,15
148	57	10,29	1	45,71
149	55	8,55	1,26	45,19
154	48	9,10	1,80	37,10

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 155	90,4	15,0	2,32	73,08
156	62,9	11,30	1,14	50,46
161	158,9		2,76	
162	92	14,56	1,17	76,27
163	72,6	11,40	1,11	60,09
169	101,6	14,63	0,92	86,05
170	105,3	15,07	1,17	89,06
171	84,7	16,24	1,48	66,98
175	128,1	18,18	2,01	107,91
176	115,5	16,41	2,88	96,21
177	126	18,16	2,54	105,30
182	80	12,36	1,63	66,01
183	74	16,93		
184	51,1	15,15	0,93	35,02
186	64,4	11,93	1,22	51,25
190	93,7	8,44	1,23	84,03
191	76,1	9,58	1,70	64,82
196	107,9	10,95	2,60	94,35
197	95,9	11,41	3,46	81,03
198	113,4	23,39	1,92	88,09
203	68,5	10,56	2,13	55,81
204	65,5	11,63	1,75	52,12
205	61,2	10,40	3,80	47,00
210	67,2	9,55	1,76	55,89
211	80	7,30	2,50	70,20
212	70,7		2,88	
218	110,5	10,64	2,12	97,74
219	34,4	5,28	1,47	27,65
225	80	7,98	1,57	70,45
226	45,7	5,60	1,90	38,20
227	57,7	6,14	0,89	50,67
232	94	12,53	3,83	77,54
233	90,5	8,25	2,13	80,12
234	83,3		1,73	
239	52,8		1,43	
240	64,7	6,38	1,58	56,74
241	50,6		2,37	
246	69,2	2,20	1,50	65,50
247	126,1	9,49	2,24	114,37
248	106,1	8,15	1,86	96,09
253	134,8	7,90	2,38	124,52
254	83,4	3,22	2,38	77,80
255	73	6,05	2,38	64,57
260	112,9	5,93	2,21	104,76
261	49,2		1,84	
262	56,2	7,28	2,24	46,68
267	96,2	4,69	2,68	88,83
268	68	5,82	1,78	60,40
269	63,6	5,22	2,74	55,64
275	80,6	6,57	1,49	72,54
276	86	7,43	0,93	77,64
281	67,5	5,13	1,11	61,26
282	58,7	6,67	1,34	50,69
283	60,6	5,18	2,52	52,90

F... (SUITE)

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 288	75	7,51	1,31	66,18
289	66,9	7,70	3,06	56,14
290	50,2	7,04	1,20	41,96
295	60,4		2,69	
296	70,7	9,94	2,45	58,31

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 297	50,5	9,78	1,96	38,76
302	52,7	8,09	2,01	42,60
303	38,2	4,71	1,20	32,29
304	98,5	11,66	2,04	84,80

T...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	164,2		4,48	
7	160	29,54	2,53	127,93
8	56,5	11,89	0,88	43,73
14	122,1	18,81	4,70	98,59
15	73,6	15,09	2,60	55,91
17	91	11,30	2,55	77,15
18	72,4	4,45	4,12	63,83
22	72,5	11,88	3,02	57,60
23	66,8	9,99	1,09	55,72
24	92	13,12	1,71	77,17
29	45,5	8,80	1,65	35,05
30	62,2	11,94	1,25	49,01
31	71,8	13,58	1,44	56,78
37	67,2	10,89	0,89	55,42
38	71,2		4,46	
43	83	10,34	1,45	71,21
44	80,7	10,92	2,94	66,84
45	54,4	6,77	1,03	46,60
50	77,2	6,15	3,53	67,52
51	73,1	10,21	3,68	59,21
52	56,2		1,68	

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 57	63,4		3,12	
58	63,5	6,35	3,11	54,04
59	59,1	4,17	3,13	51,80
64	77,2	4,15	4,33	68,72
65	63,4	6,78	5,90	50,72
66	60,3	7,52	2,67	50,11
71	54,5	5,70	7,12	41,68
72	53,3	5,39	2,39	45,52
73	73	6,12	4,67	62,21
78	52,5	6,40	8,42	37,68
79	42,5	6,09	2,35	34,06
80	40,2	3,77	1,82	34,61
92	31,8	2,49	0,58	28,73
93	58,4		1,05	
94	66	10,01	2,01	53,98
99	37,1	4,78	0,89	31,43
100	38,1	5,47	1,78	30,85
101	42,5		1,27	
106	38,3	1,35	3,21	33,74
107	32,4	3,10	1,08	28,22
108	36,8		2,35	

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h	DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	253,2		9,51		jour 141	44,9	6,41	1,58	36,91
7	102,7		5,0		142	46,9	9,06	2,47	35,37
8	150,5		10,95		144	69,2	7,50	1,32	60,38
9	84,5		4,77		146	240,9	9,17	1,61	230,12
14	115,6		9,83		149	130,5	1,99	1,00	127,51
15	112,5		4,18		154	98,6	5,58	1,31	91,71
16	93,4		4,01		155	80,2	9,88	1,61	68,71
21	86,6		5,5		156	83,4	12,17	0,96	70,27
22	74,8		7,8		162	70,8	5,56	1,26	63,98
23	96,8		5,67		163	113,9	16,15	1,53	96,22
35	144,5		3,39		168	59,3	7,29	0,78	51,23
46	32,2		1,8		169	49,3	7,36	1,49	40,45
49	31,6	12,39			170	142		5,02	
51	77,1	5,21			183	89,1	3,15	6,05	79,90
56	85,6	9,23	3,55	72,82	184	54,4	6,55	2,33	45,52
57	136,1	14,24	3,33	118,53	185	38,6	4,46	1,51	32,63
58	116,2	11,40			190	62,6	7,83	2,56	52,21
63	81,3		1,55		191	88,1	4,49	3,43	80,18
65	88		1,21		192	59,5		2,58	
70	21		0,48		197	57,2		4,12	
71	100	11,16	2,98	85,86	198	66	6,48	3,60	55,92
73	80,9	3,09	2,74	75,07	199	51,5		2,59	
77	141,5	11,53	2,90	127,07	204	155,2	12,40	2,50	140,30
78	45	9,44	2,06	33,50	205	82,4	5,07	2,45	74,88
79	98,2	9,96	2,57	85,67	206	124,8	5,73	2,07	117,00
85	198,2	5,94	1,85	190,41	211	48,6	3,90	1,62	43,08
86	67,3	8,06	1,49	57,75	212	73,1	4,91	2,25	65,94
91	65	7,82	1,81	55,37	213	71,7	4,80	1,72	65,18
92	69	5,44	2,43	61,13	218	60,5	3,75	1,52	55,23
93	64,4	2,45	2,15	59,80	219	39,5		2,75	
98	67,6	2,54	1,35	63,71	220	25,2	2,81	2,02	20,37
99	96	8,34	1,80	85,86	225	81,1	2,39	1,41	77,30
100	125,8	7,72	1,73	116,35	226	68,3	4,30	1,57	62,43
105	65,5	6,12	1,59	57,79	227	54,8	2,44	1,32	51,04
106	55	5,14	1,41	48,45	233	56,2	4,01	1,86	50,33
112	55,6	6,54	1,35	47,71	234	58,9	2,46	1,04	55,40
113	82,1	5,77	1,70	74,63	246	80,5	6,80	2,78	70,92
114	64,2	7,62	1,90	54,68	247	59,8	2,39	5,46	51,95
119	64,3		1,58		248	80,2	4,13	6,18	69,89
120	26,4	13,66	1,70	11,04	253	26		4,76	
121	86	7,18	1,26	57,56	254	35,7	2,91	3,55	29,24
127	71,2	9,94	1,14	60,12	260	58,6	4,49	1,98	52,13
128	45	4,08	0,98	39,94	261	46,2	3,15	1,33	41,72
129	92	10,50	2,13	79,37	262	54,5	4,37	3,01	47,12
133	103	7,73	1,56	93,71	267	31		0,78	
134	73,5	6,58	1,97	64,95	268	83	7,39	1,54	74,07
135	30	4,93	0,76	24,31					
140	67,5	9,41	1,64	56,45					

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h	DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	137,1				jour 140	104	16,64	3,44	83,92
2	175,1				141	85		2,98	
3	194,7				146	47,4	7,30	0,74	39,36
4	143				147	94,9	12,67	3,87	78,36
5	174,3		11,41		148	54,3	7,16	1,24	45,90
8	166,4		7,60		153	136,6	15,73	1,86	119,01
9	88,6		6,77		154	130,6	14,04	1,38	115,18
10	65,9		4,09		155	146,9	9,98	3,98	132,94
11	227,9		10,64		159	101,5	15,18	2,38	83,94
15	324,4		9,88		160	83,1	10,01	2,91	70,18
16	486,8		18,92		161	97,8	10,72	3,6	83,48
17	263,4		9,0		167	112,9	11,81	4,28	96,81
18	407		7,23		168	59	8,79	1,24	48,97
19	298,4		9,60		174	84,2	8,70	3,04	72,46
29	193,4		2,56		175	26,4		0,98	
31	100,2		3,56		176	68	6,90	1,58	59,52
32	123,5		3,72		188	87,2	9,50	3,83	73,87
36	237,5		6,0		189	64	8,99	2,52	52,49
37	175,3		3,51		190	87,7	13,31	5,04	69,35
38	227,6		6,08		195	147,5	16,17	4,39	126,94
54	186,8	18,68	4,37	163,75	196	89,2	5,50	5,22	78,48
56	242,9	12,14	5,37	225,39	197	111,1		2,79	
68	139,1		2,31		202	58		1,91	
69	137,6		4,64		203	87,8	8,88	2,30	76,62
70	165,7		2,53		204	71,4		2,03	
75	243,4		5,98		209	88,6	11,02	2,40	75,18
76	135,6	12,36	5,16	118,08	210	83,1	5,45	1,80	75,85
77	110	10,69	4,55	94,76	211	86,4	5,90	1,85	78,65
82	149,8	5,48	3,66	140,66	216	82,1	5,67	4,33	72,10
83	144,7		2,85		217	93,8	8,77	3,47	81,56
84	168,5	9,85	3,38	155,27	218	97,7	9,73	4,18	83,79
89	122,7	5,67	4,58	112,45	223	79,8	9,15	1,37	69,28
91	181	9,08	3,07	168,85	224	58,9		2,34	
92	110,2	4,55	2,31	103,34	225	45,6	5,40	2,31	37,89
96	208,6	15,18	6,95	186,47	230	88,2	3,11	1,95	83,14
97	213,7	16,86	8,56	188,28	231	80,5	4,43	2,18	73,89
98	144,4	16,00	6,32	122,08	232	79,8	4,13	2,97	72,70
104	163,2		2,69		239	84,1	6,03	1,67	76,40
105	133,6	9,94	4,61	119,05	244	83,2	9,68	0,58	72,94
106	142,3	8,74	5,27	128,29	245	103,4	4,42	2,90	96,08
111	112	7,13			246	80	2,82	1,95	75,23
112	95,5	17,57			251	89,8	4,22	11,22	74,36
113	110,4	12,10			252	59,6	5,18	5,16	49,26
118	75	7,17	3,48	64,35	253	81,9	7,29	4,66	69,95
119	73,4	8,13			258	68,2			
120	66,6	12,10			259	67	14,74	4,44	47,82
124	83,3				260	57,7	5,93	2,01	49,76
125	89,6	11,22			265	43,8	6,76	3,20	33,84
126	23,1	11,70			267	87,6	11,46	3,18	72,96
139	138	15,62	3,89	118,49					

N...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h	DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	56,4		6,60		jour 140	50,4	3,47	1,34	45,59
1	26,4		10,63		141	45,6	3,76	2,56	39,28
2	54,3		4,74		142	45,8	5,54	2,12	38,14
10	80		5,12		148	21,7	3,43	0,69	17,58
14	67,8		4,56		149	38	3,04	0,84	34,12
15	74,5		7,16		150	32,8	2,59	0,92	29,29
16	59,4		5,61		154	40,3		1,37	
21	251,5		3,58		155	52,4	4,64	1,80	45,96
22	96,7		6,38		156	41,8	4,29	1,61	35,90
28	46		1,18		162	67,8	6,10	1,18	60,52
30					163	16,6	4,68	1,86	10,06
35	62,1		4,07		164	45,1	5,29	3,89	35,92
37	46,3		3,60		168	61,3	4,33	1,07	55,90
42	62,5		2,27		169	62,5	3,40	2,73	56,37
43	53,7		2,92		170	38,5	5,21	2,75	30,54
44	40,9		3,89		175	56	7,55	2,26	46,19
49	44,7		5,09		176	29,7	4,79	2,01	22,90
50	28,5		3,10		177	24,4	4,64	1,70	18,06
51	61		4,45		179	32,1		1,34	
56	54,2		5,22		183	122,7	8,98	3,07	110,65
57	36,5		2,47		184	110,2	7,09	2,34	100,77
58	35,2		2,88		189	59,4	7,55	2,41	49,44
63	43,9		1,35		190	46,2	6,35	2,74	37,11
64	44,2		0,91		191	37,7	5,25	1,99	30,46
65	44		1,01		196	48,8	5,02	2,99	40,79
74	57,4		2,54		197	41,9	5,09	1,88	34,93
78	29		3,15		198	52,4	6,58	4,36	41,46
79	37,9		2,1		203	41,9	3,71	1,76	36,43
86	36	5,75	4,29	25,96	204	56	5,42	2,68	47,90
87					205	26,4		2,76	
88	36	4,62	1,23	30,15	211	25,3	5,27	2,03	18,00
91	50,2	6,46	4,39	39,35	212	53,8	4,44	1,31	48,05
92	55,8	3,98	4	47,82	218	45	5,13	2,19	37,68
93	50,2	2,77	4,39	43,04	219	68,4	7,04	2,96	58,40
98	52,9		2,46		220	41,6	2,79	2,21	36,60
99	68,9		5,20		225	47,9	3,51	2,27	42,12
100	51		2,85		226	45,9	2,90	3,10	39,90
105	60,6		1,72		227	44,7		2,42	
106	45,6	5,52	4,42	35,66	232	41,6		3,90	
107	52,7	4,42	4,30	43,98	233	27,5	2,65	1,95	22,90
112	59,9	6,10	1,98	51,82	234	45,8		1,95	
113	67,3		3,89		239	38,1	3,86	3,26	30,98
114	55,5	3,46	2,57	49,47	240	37,4	3,47	1,55	32,38
115	76,4		2,48		241	41,6	2,88	1,85	36,87
119	93,6	2,91	2,42	88,27	246	41,2	3,69	2,83	40,34
120	85	2,47	1,76	80,75	247	42,4	3,41	3,78	35,21
121	57,3	2,85	1,16	53,29	248	39,1	3,19	2,79	33,12
126	38	2,92	1,89	33,19	253	31,6	2,20	0,56	28,84
127	37,9	4,02	1,32	32,56	254	47,2		1,13	
128	42,6	4,43	1,89	36,28	255	45,6	4,20	1,20	40,20
133	38,4	4,30	1,34	35,44	260	52,9	2,16	4,79	45,95
134	24	2,99	0,99	20,02	261	46,9	3,77	3,99	39,14
135	61,2	5,04	1,70	54,46	262	17,4	2,22		

N... (SUITE)

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 268	44,8	1,88	4,90	38,02
269	46,8	2,44	2,60	41,76
274	49	3,20	4,88	40,92
275	29,6	2,64	2,14	24,82
276	29,5	1,66	2,27	25,57
281	45,8	2,64	4,44	38,72

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 282	61,8	3,47	3,78	54,55
283	34,8	3,93	1,46	29,41
288	43,6		4,16	
289	35,1	6,22	4,20	24,68
290	28,1	3,72	3,14	21,24

B...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	108,3	18,36	9,99	79,95
1	98,6	17,26	2,98	78,36
2	106,1	19,51	3,79	82,70
7	145,2	22,03	6,56	116,61
17	119,9	18,34	2,38	99,18
22	96,4	10,38	1,85	84,17
23	84,1	14,16	1,68	68,28
24	113,4	17,30	1,51	94,59
30	128	7,26	4,91	115,83
35	145	14,36	5,01	125,63
36	26,6	12,88	3,72	10,00
37	105,8	11,28	4,48	90,04
42	220,3		1,66	
43	198,4	14,87	4,24	179,29
44	116,1	14,22	2,90	98,98
49	140,8	19,69	3,38	117,73
50	140		3,60	
51	102,7	7,95	2,45	92,30
56	121,2	11,41	1,56	108,23
63	114,8	11,66	2,60	100,54
64	114,9	8,85	3,71	102,34
70	110,2	10,46	1,60	98,14
72	74,8	5,60	1,27	67,93
73	127,7	9,09	4,03	114,58
84	141,6	16,53	4,86	120,21
85	143,2	14,65	4,52	124,03
86	125,2		3,67	
92	120,1	11,61	3,43	105,06
93	111,8	5,76	3,14	102,90
98	67,9	3,64	4,45	59,81
99	108,3	10,02	3,32	94,96
100	138,6	9,93	2,96	125,71

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 106	84	6,38	2,44	75,18
113	78,2	9,01	1,70	67,49
114	74,7	8,11	2,82	63,77
115	81,2	9,02	3,64	68,54
120	76,7		3,56	
127	170,2	8,87	7,90	153,43
128	56,5	4,44	2,10	49,96
134	80,6	6,77	4,01	69,82
135	103	9,13	2,25	91,62
136	80,8	6,80	0,82	73,18
141	56	4,20	1,34	50,46
142	46,2	3,90	1,73	40,57
143	77,5	5,16	4,15	68,19
148	112,6	10,61	7,80	94,19
149	88,2	4,28	1,75	82,17
150	108,9	8,89	2,73	97,28
156	54,2	3,26	2,06	48,88
157	78,2	7,26	3,29	67,65
158	100,6	7,10	7,71	85,79
163	62,2	8,20	2,62	51,38
164	34,9	3,26	1,37	30,27
165	76,7	7,09	5,12	64,49
170	40	3,35	2,06	34,59
171	67,2	7,55	5,66	53,99
172	41,3	4,07	3,75	33,48
184	52	5,99	1,27	44,74
185	59,9	3,96	2,13	53,81
186	43,5	4,51	1,65	37,34
191	29,1	3,01	1,39	24,70
192	60,2	8,84	2,83	48,53
193	39,2	2,66	1,65	34,89

V...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	56,1		4,59	
2	81,7		8,25	
21	78,5		1,49	
22	58,1		2,4	
23	78,2		1,8	
28	87,6	10,9	2,93	73,77
29	96,1	8,71	2,68	84,71
30	63,7	8,47	1,73	53,50
35	72,5	8,11	2,14	62,25
36	74,4	11,32	1,56	61,52
37	63,4	6,22	1,18	56,00
42	39,1		0,53	
43	141,7		1,96	
44	66,5		1,06	

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 49	115		1,86	
50	79,9	6,70	1,66	71,54
51	83,2	6,48	1,42	75,30
56	49,6	4,98	1,23	43,39
57	84,2		2,08	
58	84,2	4,40	1,55	78,25
64	99,7	2,31	1,83	95,56
65	150	2,78	1,52	145,70
71	63	7,07	2,84	53,09
72	30	4,81	1,29	23,90
73	32,2	3,78	1,17	27,25
79	66,3	5,93	1,82	58,55
80	49,7	6,56	1,12	42,02
81	41,9	4,61	0,85	36,44

G...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	52,2			
1	86,9			
14	142,1		11,36	
15	74,3		8,13	
17	109,6		4,29	
21	113,6		5,80	
22	82,4		3,20	
23	104,4		4,42	
28	119,3		6,30	
29	122,8		7,20	
30	82,8		7,91	
36	139,3		6,84	
42	114		2,32	
44	69,6		2,32	
49	126,2		4,07	
56	117,9		3,52	
57	91		3,81	
58	79,4		2,37	
63	101		5,68	
64	101,5		3,33	
65	176,7		6,19	
70	95		6,72	
71	94,6		10,4	
72	129,4		9,24	
84	71,3		2,19	
85	94,6		1,82	

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 91	114,8		4,09	
92	149		4,7	
93	93,8		2,6	
98	88,5	10,9	1,89	75,71
99	72,8	11,3	1,71	59,79
100	87,6	12,6	1,48	73,52
105	76,8	15,7	2,67	58,43
106	133,9	12,1	3,20	118,60
107	71,7	9,55	1,96	60,19
113	122,6		4,54	
114	76,7		1,60	
115	78,2		1,78	
120	61,9	8,53	1,49	51,88
121	67,8	8,79	1,75	57,26
122	57,1	2,45	1,72	52,93
126	91,1	9,86	1,98	79,26
127	86,4		1,80	
128	101,1	5,39	1,55	94,16
134	124,1	9,66	1,72	112,72
135	118,5	1,41	1,50	115,59
136	61,3	3,97	2,08	55,25
141	75,1	9,61	2,31	63,18
142	54,2	7,04	2,04	45,12
143	60	2,95	2,15	54,90
146	59,4	9,45	2,32	47,63
147	43,7	6,31	1,24	36,15

P...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	51,2		1,80	
1	53,9		3,06	
2	95,4		3,84	
14	59,6		1,82	
15	53	7,02	2,24	43,74
16	69,9	7,74	2,49	59,67
21	48,7	6,41	2,47	39,82
22	45,5	5,88	2,25	37,37
28	22,3	2,95	1,25	18,10
29	53,1	6,57	1,61	44,92
30	35,4	4,18	3,61	27,61
35	46,1	5,80	1,94	38,36
36	48,2	7,93	5,23	35,04

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 37	62,1		1,88	
42	62,6	7,44	2,75	52,41
43	46,3	5,31	2,11	38,88
44	55,2	7,08	1,69	46,43
49	41,6	4,02	1,62	35,96
50	36,4	3,53	2,83	30,04
51	57,5	5,84	2,99	48,67
57	51,1	5,24	1,75	44,11
58	28	3,56	1,19	23,25
63	48,4		2,56	
64	40,4	3,46	1,82	35,12
65	46	3,76	2,43	39,81

F...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	97,1		3,42	
1	89,6	15,87	5,95	67,78
2	102,5	22,64	8,99	70,87
7	97,6	11,92	5,24	80,44
8	80,3	10,35	4,26	65,69
9	110,8	15,56	6,79	88,45
14	162,2	21,30	5,57	135,33
15	106,7	15,36	7,50	83,84
17	97,2	14,27	5,10	77,83
22	174,3	14,72	5,24	154,34
23	90,3	9,30	3,60	77,40
29	102,2	11,50	1,20	89,50
30	75,3	13,06	1,59	60,65
31	86,3	5,52	2,02	78,76
36	117	10,12	2,79	104,09
37	92,1	11,94	4,31	75,85
38	119,3		3,62	
43	91,1		2,05	
44	103	9,43	2,03	91,54
45	89,1		1,73	
50	124,8	17,28	4,14	103,38
51	142,1	14,69	2,82	124,59

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 52	103,8	4,59	2,76	96,45
57	97,8	7,92	5,01	84,87
58	92,5	7,30	3,73	81,47
59	78,2	4,64	2,74	70,82
64	73,7	5,02	1,33	67,35
65	82,9		3,05	
66	69,9	6,34	3,95	59,61
71	82,6	6,86	5,12	70,82
72	95,4	5,65	3,76	85,99
73	115,3	7,60	2,67	105,03
79	111	6,66	3,66	100,68
80	96	8,55	2,33	85,12
85	102	6,68	1,14	94,18
86	90,2	4,84	0,40	84,96
87	78,1	4,03	0,55	73,52
92	77,1	3,49	1,44	72,17
93	60,3	3,43	1,59	55,28
94	51,1	5,46	1,44	44,18
101	61,9	6,29	2,80	52,81
106	75,4	9,24	2,39	63,77
107	93,7	11,11	2,68	79,91
108	71,5	7,18	1,93	62,39

GROUPE : P.O.A.N. +

J...

Sexe masculin

né le 19. 5.1954

Etudié sur 224 jours

G...

Sexe masculin

né le 30. 6.1934

Etudié sur 65 jours

T...

Sexe masculin

né le 15.11.1921

Etudié sur 73 jours

P...

Sexe masculin

né le 19. 6.1930

Etudié sur 22 jours

D. R...

Sexe masculin

né le 18. 6.1939

Etudié sur 102 jours

C...

Sexe masculin

né le 23. 1.1938

Etudié sur 94 jours

K...

Sexe masculin

né le 29. 7.1954

Etudié sur 438 jours

D. S...

Sexe masculin

né le 2. 9.1941

Etudié sur 158 jours

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h	DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	96,6	11,71	2,43	82,46	jour 133	82,3	4,75	2,02	75,53
1	144,2	18,53	3,91	121,76	138	136,6	9,04	3,58	123,98
2			4,87		139	129,9	13,63	2,98	113,29
29	122,4		4,15		140	95,8	11,00	1,71	83,09
30	186,7		2,24		145	80,3	8,64	4,24	67,42
32	161		2,15		146	85,4	9,60	4,94	70,86
43	57,1	6,10	2,28	48,72	147	91	10,26	4,69	76,05
44	46,7	6,02	1,90	38,78	152	17,7	7,49	4,52	5,69
45	88,8	12,43	4,59	71,78	153	124,1	10,00	4,51	109,59
50	109,2		5,04		154	106,1	10,90	3,11	92,09
51	105	12,25	6,27	86,48	159	101,7	13,77	1,17	86,76
57	56,2	11,50	4,51	40,19	160	122,5	8,25	4,30	109,95
58	34,5	4,17	1,08	29,25	161	112,8	8,44	2,68	101,68
64	100,8	11,20	2,08	87,52	166	83,8	7,82	2,23	73,75
65	133,6	16,26	2,41	114,93	167	85,8	10,01	2,20	73,59
66	118,7	12,29	2,11	104,30	168	53,9	5,62	1,25	47,03
71	92	10,00	2,30	79,70	173	72	8,19	2,07	61,74
72	76,4	9,28	2,08	65,04	174	91,8	6,12	2,47	83,21
73	100	8,90	5,34	85,76	175	91	9,42	3,82	77,76
78	225,2	17,81	8,96	198,43	180	75,3	9,69	2,00	69,61
79	88,2	8,82	1,37	78,01	181	80,8	10,90	4,87	65,03
80	57,5	6,60	0,82	50,08	182	85,4	8,70	4,26	72,44
86	119,7	14,53	3,87	101,30	187	78,5	8,49	3,30	66,71
87	88,8	10,94	2,54	75,32	188	91,5	6,90	2,53	82,07
88	126,6	15,44	5,75	105,41	189	84,2		1,88	
93	98,5	11,08	1,73	85,69	194	99,9		4,51	
94	100,4	12,83	2,02	85,55	195	112,2	8,10	3,52	100,58
95	90,2	14,34	2,16	73,70	196	81,9	8,12	3,00	70,78
100	147,9	18	3,27	126,63	201	88,3	7,03	3,76	77,51
101	69,6	7,30	1,61	60,69	202	111,1	10,74	3,98	96,38
102	97	11,08	1,40	84,52	203	96,6		3,20	
107	118,3	12,45	2,11	103,74	208	73,3	4,54	1,75	67,01
108	75,6	7,32	1,75	66,53	209	90,2	6,08	2,00	82,12
114	92,9	8,30	0,77	83,83	210	101	5,93	2,83	92,24
115	140,9	12,47	1,39	127,04	222	102,5	8,34	2,51	91,65
116	98,9	9,11	1,24	88,55	223	42,9	4,49	1,84	36,57
131	21,2	8,06	2,20	10,94	224	93,8	9,50	2,12	82,18
132	63	4,05	1,53	57,42					

G...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	88,9	14,72	3,94	70,24
1	159	25,95	7,62	125,43
2	137	12,87	8,62	115,51
7	78,7	18,05	2,21	58,44
8	73,8	15,60	2,92	55,28
9	85,4	16,24	3,41	65,75
14	85		2,78	
15	82,1	14,08	3,11	64,91
16	90,2	15,00	7,52	67,68
21	116,6	14,29	2,28	99,93
22	119,1	17,98	2,63	98,49
28	132,6	17,33	1,61	113,66
29	142,8	19,61	2,59	120,60

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 30	49,1	6,41	0,64	42,05
35	141,1	23,14	6,22	111,74
36	134,7	22,71	6,18	105,81
37	87,7	13,46	2,66	71,58
42	80,6	7,85	3,40	69,35
43	103,9	16,15	3,80	83,95
44	101,8	16,97	2,38	82,45
56	125,3	16,42	5,45	103,43
57	87,5	9,57	5,92	72,01
58	132,8	10,71	3,59	118,50
63	97	10,49	7,24	79,27
64	69,8	7,86	3,75	58,19
65	163,4	19,33	6,04	138,03

T...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	45,8		4,37	
1	36,4		4,96	
2	46,6		5,82	
28	45	3,62	1,38	40,00
29	38,6	3,91	2,08	32,60
30	35,1	2,84	1,86	30,40
35	30,4	3,21	3,08	24,11
36	28	2,25	0,68	25,07
37	27,2	3,84	1,36	22,00
43	38	3,01	2,36	32,63
44	34,9	2,58	1,47	30,85
45	99,2	3,17	4,53	91,50

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 50	29,2	5,18	1,42	22,60
51	36,9	4,36	1,81	30,73
52	21,8	2,96	1,58	17,26
57	31	3,74	1,74	25,52
58	45,6	5,38	2,40	37,82
59	34,6	5,05	1,61	27,94
64	32,2	4,43	1,37	26,40
65	34,7	3,96	1,17	29,57
71	27,2	2,65	0,62	23,93
72	41,4	3,99	1,32	36,09
73	36,5	4,14	0,77	31,59

P...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	23,2	4,18	0,62	18,40
1	57,3	9,24	1,36	46,70
4	53,5	8,93	1,38	43,19
7	16,1	2,56	3,55	9,99
12	43,9	8,30	1,90	33,70

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 13	39,8	4,05	0,89	34,86
14	41,1	7,83	1,63	31,64
20	28,5	3,62	1,06	23,82
21	50,6	6,88	1,53	42,19
22	36,9	4,87	1,51	30,52

D. R...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	38		0,93	
3	57,2	4,47	3,56	49,17
4	42,8	5,10	1,76	35,94
10	28,1	3,82	3,36	20,92
11	51,5		4,46	
16	50,2	3,50	3,15	43,55
17	55,6	4,46	3,48	47,66
18	46,3	4,37	2,36	39,57
30	8,6	2,50	2,22	3,88
31	53,4	3,14	3,38	46,89
32		4,58	3,24	
38	63,5	7,81	1,59	54,10
39	69,5	9,30	2,03	58,17
44	93,1	10,62	3,65	78,83
45	71,2	9,57	3,16	58,47
46	76,3	11,16	4,52	60,62
51	73	9,96	2,95	60,09
52	73,6	7,71	3,42	62,47

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 53	78,9	6,78	3,39	68,73
58	76,9	6,88	3,10	66,92
59	78,6	6,40	7,10	65,10
60	86,6	6,79	3,19	76,62
65	43,6	3,86	3,04	36,70
66	69,9	8,28	4,62	57,00
67	65,2		2,72	
72	75,5		4,03	
73	73	5,18	3,36	64,46
79	64,7	5,55	4,53	54,62
80	74,4	2,81	4,44	67,15
86	56	2,88	2,88	60,24
87	40,2	3,84	1,46	34,90
88	44	3,46	1,41	39,13
100	82,5	6,70	4,43	71,37
101	57,6	5,11	2,66	49,83
102	44,8	5,45	2,39	36,96

C...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	114,3		5,07	
1	124,3		5,81	
2	73,4		2,18	
36	117,4	12,60	3,35	101,45
37	62	3,32	3,42	55,26
42	148,4	14,84	3,96	129,60
43	121	13,06	6,30	101,64
49	90	11,84	5,24	72,92
50	20,9	6,55	5,22	9,13
51	98,8	12,31	3,88	82,61
56	24,6	2,86	1,21	20,53

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 58	97,7	11,54	5,03	81,13
65	151,6	19,66	3,60	128,34
66	68,4	10,46	2,74	55,20
70	82,2		4,23	
78	91,1		2,77	
79	127,4	13,08	2,88	111,44
80	88,4	9,28	2,99	76,13
92	51,7		2,53	
93	64,7	6,29	3,17	55,24
94	70,6	10,34	2,36	57,90

K...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	209,2		4,07	
2	171,9	23,89	2,11	145,90
3	287,7	25,12	2,46	260,12
4	134,3	16,86	2,02	115,42
5	136,6	24,16	1,76	110,68
6	194,2	29,54	2,82	161,84
9	96	9,08	1,70	85,22
10	113,8	10,66	2,11	101,03
11	106,6	9,85	2,41	94,34
16	91,3	5,39	1,35	84,56
17	47,5	7,69	0,85	38,96
23	87,4	7,60	3,40	76,40
24	113,6	23,06	5,25	85,29
25	78	15,40	4,01	58,59
30	82,5	14,57	2,35	65,58
31	83,3	13,90	2,65	66,75
32	99,4	10,43	3,70	85,27
37	63,3		2,39	
38	130,9	20,09	4,06	106,75
39	72,6	10,98	2,55	59,07
45	106,5	15,20	0,92	90,38
46	171,9	21,25	5,11	145,54
51	66,7	8,69	0,82	57,19
58	82,5	13,83	6,96	61,71
59		12,39	2,73	
60	35,5	10,13	1,58	23,79
62	79,6	10,53	6,16	62,91
66	114,2	4,24	2,85	107,11
67	120,6	6,62	3,00	110,98
79	66,4	8,89	1,50	56,01
80	101,2	9,95	1,77	89,48
81	85,2	11,67	2,70	70,83
86	68,2		3,65	
87	117,6	10,06	1,16	106,58
88	60,9		1,50	
94	83,3	7,62	0,98	74,70
95	66,7	8,87	0,73	57,10
101	72,2	9,07	1,07	62,06
102	62,7	7,29	1,33	54,08
103	57,7	9,83	0,95	46,92
108	70,2	5,06	0,81	64,33
109	65,5	5,29	2,25	57,96
110	61,3		1,78	
115	45,4		1,12	
116	52,7	6,12	0,83	45,75
117	54,3		0,69	
122	62,3	4,93	1,75	55,62
123	58,9	5,03	1,89	51,98
124	57,1	4,64	1,26	51,20
129	55	3,63	1,05	50,32
130	68,4	3,36	1,43	63,61
131	78,2	4,56		
136	82,4	3,22	0,81	78,37

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 137	66,2		0,99	
138	54,9	4,14	0,95	49,81
143	76,2	4,05	2,45	69,70
144	90	4,99	2,29	82,72
145	57,6	2,75	1,65	53,20
151	70,2	3,68	2,15	64,37
152	53,7	2,31	2,21	49,18
157	70,8	3,68	1,83	65,29
158	69	4,10	1,20	63,70
159	70,2	3,64	2,26	64,30
164	64,2	5,74	1,86	56,60
165	66,8	2,23	2,00	62,57
166	58,5	2,73	1,44	54,33
171	60		1,36	
172	60	6,84	1,14	52,02
173	40	3,89	1,01	35,10
178	54,8	6,14	1,52	47,14
179	65,6	4,74	2,12	58,74
180	83,8	8,16	1,80	73,84
185	73		1,60	
186	63,4	6,96	1,12	55,32
192	48,6	5,92	0,54	42,14
193	55,4	7,70	0,50	47,20
194	61,5	6,87	0,27	54,36
199	58,2	7,16	0,86	50,18
200	60,1	3,06	1,06	58,10
201	64	4,43	1,31	58,26
206	53	7,14	1,08	44,78
207	60,4	8,18	1,10	51,12
208	57,4	6,27	1,56	49,57
213	36,9	5,26	1,21	30,43
214	41	7,62	1,06	32,32
215	35,8	7,07		
221	67,7	5,83	1,01	60,86
222	63,7		1,67	
227	15,9	6,66	1,17	8,07
228	70,7	3,83	2,20	64,67
229	43,6	5,06	1,34	37,20
234	46,4	4,64	1,74	40,02
235	49,3	3,15	1,72	44,43
236	69,6		2,33	
241	52,6		1,65	
242	59,4	6,38	2,00	51,02
248	70,3	5,73	2,30	62,27
249	36,3	2,60	1,04	32,66
250	64	6,05	1,85	56,10
255	47,9	4,33	1,17	42,40
256	32	6,98	2,00	23,02
257	56,2	4,12	1,53	50,55
262	57,7	4,33	1,39	51,98
263	48,4	3,65	1,29	43,46
264	53	2,46	2,96	47,58
275	54,2	4,03	1,58	48,59

K... (SUITE)

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 277	56,1		1,48	
278	32,9	2,48	1,26	29,16
283	47,2	6,73	6,01	34,46
284	40,7	3,61	2,51	34,58
285	53,1		2,20	
290	66	3,29	3,50	59,21
291	59,6	1,42	1,64	56,54
292	63,7		1,82	
297	64,5	5,25	1,65	57,60
298	69,5		2,43	
299	49	4,00	1,52	43,48
304	44,2	5,56	1,74	36,90
305	36,6	4,95	2,20	29,45
306	36,4	4,13	1,99	30,28
325	53,1	6,62	3,67	42,81
326	96,4	8,34	2,85	85,21
327	53,3	4,38	2,61	46,31
332	50,8	6,07	1,41	43,32
333	54,6	4,18	2,96	47,46
334	56,6	2,90	3,36	50,34
339	50	2,54	3,62	43,84
340	39,1	0,77	0,88	37,45
341	42,7	2,55	1,89	38,26
347	39,9	4,67	2,01	33,22
328	55,4	5,00	3,05	47,35
353	46	5,40	2,46	38,14
354	39,2	5,02	2,47	31,71
355	35,2	2,83	1,65	30,72
360	39,7		1,52	
361	37	4,74	2,05	30,21
362	27,7	2,90	1,18	23,62

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 367	39,1		1,34	
368	34	3,42	0,95	29,63
369	41,4	4,55	1,10	35,75
373	37,4	4,82	0,52	32,06
374	43,5	4,13	1,33	38,04
375	55,4	4,77	1,26	49,37
376	45	3,79	1,33	39,88
381	45,2		1,92	
382	32,2	3,28	1,40	27,52
383	48	3,70	2,30	42
388	51,3		1,75	
389	41,9	4,07	1,46	36,37
390	41,7	2,90	2,22	36,58
395	52,6			
396	58,7	2,20		
397	22,7	2,51		
402	35,4	2,63	1,86	30,91
403	20,8	3,04	1,48	16,28
404	27,5	2,33	1,14	24,03
409	48,4		1,22	
410	63	1,50	1,60	59,90
411	46,1		1,19	
423	34,3		1,15	
424	44		1,22	
425	31,7		1,70	
430	35,7		1,49	
431	37,1		2,06	
432	26,8		1,93	
437	48,6		2,13	
438	33		1,17	

D. S...

DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h	DATE	TOTALE mg/24h	NON DIALYSABLE mg/24h	LIBRE mg/24h	DIALYSABLE mg/24h
jour 0	187,2		10,52		jour 93	121,7	15,14		
1	271,9		9,94		94	106	11,17	1,71	93,12
2	167,4		5,86		95	88,1	9,67		
14	223,1		3,38		100	86,9	8,85		
15	128,1	12,99	2,76	112,35	101	120,6	11,98		
16	127,7	11,38	3,94	112,38	102	131,2	15,42	3,00	112,78
21	117,5	14,87	7,00	95,63	107	91,6		2,96	
22	129,7	7,71	9,45	112,54	108	86,4	6,25	2,24	77,91
23	150,8	9,92	4,70	136,16	109	78,6	5,38	1,52	71,70
28	30,4	2,86	0,78	26,76	114	78,1	7,97	2,48	67,65
30	101,9	13,39	4,07	84,44	115	92,7	9,16	2,42	81,12
39	93,1	14,31	3,48	75,31	116	100,2	9,52	2,28	88,40
49	170,8		4,20		121	80,5	6,60	1,58	72,32
51	92,8	12,30	2,52	77,98	122	111	8,99	2,03	99,98
52	99,8	11,86	2,03	85,91	123	84,5		2,53	
58	37,1	4,63	0,48	31,99	128	104,4		3,58	
59	77,6	9,21	1,43	66,96	129	84,3	8,75	2,64	72,91
60	79,9	10,51	1,10	68,29	130	125,8	9,56	3,22	113,02
65	99,3	11,88	2,28	85,14	135	110,4	12,34	3,38	94,68
66	91,6	16,12	2,01	73,47	136	72,4	6,96	1,98	53,46
67	90,4	7,79	1,57	81,04	137	115		2,62	
72	106,2	13,46	1,55	91,19	143	85,6	5,83	1,88	77,89
73	100,6	13,16	1,97	85,47	144	67,9	6,25	1,68	59,97
74	112,7	13,51	2,38	96,81	151	105,1	9,19	1,90	94,01
79	102,2	11,48	1,90	88,82	157	75,5	7,31	2,42	65,77
81	248	26,95	3,20	217,85	158	43,8	4,60	0,92	38,28

